Recherches expérimentales

sur la

Mutation chez les Champignons

par

FERNAND CHODAT

Docteur ès sciences

Fellow of the International Education Board (1925)

(Avec 53 figures dans le texte et sur XIII planches hors texte)

(Extrait du Bulletin de la Société Botanique de Genève 1926)

Série 2, Vol. 18, 1926

1926

Imprimerie Jent S. A., 9-11, rue Necker

Genève

NEW YORK BOTANICAL GARDEN LIBRARY
16 APR 1955

to Dr Colton, Neb.
with compliments. F. Chodat

Recherches expérimentales

sur la

Mutation chez les Champignons

par

FERNAND CHODAT
Docteur ès sciences
Fellow of the International Education Board (1925)

(Avec 53 figures dans le texte et sur XIII planches hors texte)

(Extrait du Bulletin de la Société Botanique de Genève 1926)
Série 2, Vol. 18, 1926

1926
—
Imprimerie Jent S. A., 9-11, rue Necker
Genève

Durant l'année 1925, j'ai eu l'avantage de pouvoir travailler en qualité de « *Fellow of the International Education Board* » dans la Section de Mycologie de la Station expérimentale de Rothamsted, Angleterre. Je dois à M. W. B. Brierley, Dr. Sc., chef de cette section, la suggestion de porter mon attention sur le problème de la mutation chez les champignons. Il m'est un agréable devoir, en terminant ce travail, de le remercier pour les conseils qu'il a bien voulu me prodiguer pendant mon séjour dans son laboratoire. Je ne veux pas oublier non plus toutes les facilités qui m'ont été accordées par Sir John Russell, Directeur de Rothamsted, et je me plais à reconnaître tout le profit qu'on peut retirer, dans cette institution, du contact permanent avec tant de spécialistes distingués.

Fernand Chodat,

actuellement 1er assistant à l'Institut de Botanique
de l'Université de Genève.

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/mutationchezlesc0000ferd

Recherches expérimentales

sur la

Mutation chez les Champignons

par

F. CHODAT

Introduction

§ I. NOTION DE MUTATION

On dit qu'il y a mutation, lorsque, dans une espèce bien caractérisée, apparaît une forme fille, distincte de la forme mère par des caractères qui se perpétuent dans la descendance du mutant. Appliqué à la description qui précède, le terme mutation est inéquivoque.

Mais, si on pousse plus loin l'investigation, et, qu'on cherche, sinon les causes, tout au moins les conditions antérieures qui ont contribué à l'apparition de ce descendant aberrant, on découvre que le terme mutation exprime plusieurs phénomènes, convergents par leurs résultats, mais sans rapports dans leur origine.

1. La mutation étant une irrégularité dans la constance et dans a pureté du type pour une espèce donnée, on a cherché ce qui peut avoir dérangé et contaminé l'espèce. La sexualité qui permet, par des croisements illégitimes, la combinaison d'espèces distinctes, est au premier chef responsable.

Ainsi, beaucoup parmi les exemples décrits sous le nom de mutation, en particulier chez les *Oenothera* de De Vries, ne sont-ils plus interprétés aujourd'hui, que comme des disjonctions de polyhybrides mendéliens. Cela n'écarte d'ailleurs aucunement la possibilité, même dans ce genre, de mutations vraies.

Le facteur croisement doit donc toujours être soupçonné en premier lieu, et il faut se rappeler qu'il a pu intervenir chez des organismes comme les Aspergilles, voire les Phoma, où, bien qu'inconnus, les stades sexués peuvent exister à notre insu.

Je voudrais, à ce propos, citer W. B. Brierley [1] :

„ A few words further may be said concerning the possible etiology of so-called „ mutants " in fungi. One of the great line of progress in mycology during the last two decades has been the demonstration of sexuality *in esse* or *in posse* in an even increasing number of fungi ; and he would indeed be a rash mycologist who would assert that sexuality is completely absent from any single species. We have therefore to take into consideration the probability of heterozygosis in many forms and the possibility of it in all ; which implies that a single-spore fungal culture has neither greater nor less genetic value than a single-seed or a single tuber culture derived from some probably or possibly cross-bred higher plant of unknown genetic constitution ".

2. Quand on part d'un germe unique, qui n'est lui-même point un composite issu de races croisées, soit un germe homozygotique, on obtient, par autofécondation, une descendance pure et constante et le groupe d'individus qui la constitue est appelé lignée pure. Johannsen, qui a introduit cette notion, a montré que, même au sein de lignées pures, peuvent apparaître des mutations. Le phénomène de mutation est ici tout à fait différent du précédent.

3. On a aussi prononcé le terme de mutation à propos de ces phénomènes anciennement décrits par Darwin sous le nom de « sports ». Il s'agit, chez les plantes supérieures, de la production soudaine d'un rameau distinct par sa forme ou sa couleur du reste du tissu végétatif où il s'est différencié. Ce mutant, qu'on peut obliger à fournir une descendance par bouture, reproduit des individus où le caractère muté persiste.

La notion de « sport » n'est pas absolument précise, en ce sens qu'on ne peut pas la considérer comme l'expression d'une disjonction strictement végétative ; rien, en effet n'exclut la possibilité que cette disjonction soit apparue sur un matériel hétérozygotique. Les études plus modernes sur les « rogues » (Bateson), ont précisé la question. Ce sont de véritables secteurs apparus, comme par exemple les raquettes d'Opuntia, piquantes sur une face, inermes sur l'autre. Quoiqu'il en soit, les mutations correspondant aux

[1] Ex Brierley, W. B. : « On mutation of species ». Brit. Med. Journ., octob. (1922).

termes « sports », « rogues », sont les manifestations de phénomènes multiples et mal élucidés. Tout ce qu'on peut dire est que si les noyaux des cellules génératrices de ces tissus ne sont pas nécessairement hétérozygotiques, les tissus végétatifs eux-mêmes de ces plantes doubles, n'ont pas moins été fusionnés, associés, un jour, à partir de deux espèces distinctes, soit par accident naturel, soit artificiellement par greffe. Il faut encore mentionner que dans la division végétative on a coutume de supposer que la caryocinèse sépare le matériel héréditaire en deux parts strictement égales ; mais, les observations s'accumulent et semblent indiquer que le cas le plus habituel, partage égal, peut subir des modifications, et que la caryocinèse végétative homotypique est un procès variable.

4. Enfin, un quatrième point de vue est à considérer, quant à l'origine des mutations. L'irrégularité dans la distribution des gènes peut être due à une cause externe susceptible d'agir profondément sur la constitution du noyau. Il faut avouer cependant que le nombre des expériences qui tendraient, chez les plantes supérieures, à prouver cette proposition est extrêmement restreint. Plus d'un des phénomènes de mutations induites chez les champignons pourraient servir d'illustration à ce dernier point de vue.

Ce qui vient d'être dit prouve suffisamment que la condition indispensable à toute étude sur la mutation, est la connaissance de la pureté du matériel dont on part.

La règle élémentaire est donc de partir d'une semence unique ; on a, depuis, appris que cette précaution ne suffit pas pour l'obtention d'un matériel génétiquement pur. Il faut encore procéder à l'analyse biologique pour dissocier le complexe que peut receler un germe unique.

§ II. MUTATION CHEZ LES MICROORGANISMES.

L'étude de la mutation chez les microorganismes est soumise aux mêmes règles. Mais la première de ces règles, choix d'un germe unique, est déjà difficile à observer ; aussi, la bibliographie est-elle remplie de travaux qui prétendent traiter de la variabilité et de la mutation des microorganismes, et qui n'ont pas tenu compte de cette condition capitale ; toutes les méthodes de triage qui ne sont pas fondées sur *l'observation directe du développement d'un germe*

unique, classent *ipso-facto* les travaux dans lesquels elles ont été employées dans le domaine de la génétique conjecturale.

Nous n'accorderons donc droit de cité qu'aux études qui justifient d'une technique de sélection des cellules-germes, suffisamment rigoureuse pour servir de base à une enquête sur la mutation.

Bactériologie.

Le problème de la mutation a été beaucoup étudié chez les microbes, mais rarement d'une façon qui permette de tirer des conclusions d'ordre génétique. Je ne signalerai ici que les travaux de Burri et Düggeli, sur les bactéries appartenant au groupe du *Coli-Typhosus* :

Burri, l'auteur de la méthode de sélection des bactéries au moyen de l'encre de Chine [1], a montré en collaboration avec Düggeli, que la bactérie *B. imperfectum* (du groupe coli-thyphosus), incapable de fermenter le saccharose, fournit, par culture sur un milieu à base de saccharose, une forme nouvelle, dite *B. perfectum*, capable de dédoubler le saccharose. Burri a montré cette chose curieuse, que la mutation est en potentialité dans chaque germe de *B. imperfectum* ; les conditions d'ensemencement déterminent le pourcentage de la mutation ; pour un petit nombre, 100% des germes mutent ; pour une population serrrée, une faible proportion seulement.

Burri, dans ses conclusions, renonce au terme mutation, parce qu'il considère le phénomène observé comme une adaptation graduelle ; la mutation n'est pas une acquisition de caractère, mais la réalisation de potentialités préexistantes [2].

Pour les *Actinomyces*, une étude soignée de R. Lieske [3] affirme que dans ce groupe il n'y a pas de véritables espèces qu'on puisse distinguer les unes des autres comme des unités systématiques stables. La centaine de races qu'il a étudiée montre, en effet, une variabilité physiologique et morphologique étonnante. Le même auteur mentionne un cas de mutation par secteur : une race jaune provenant d'une race rouge. Ce cas n'est regrettablement pas accompagné de documents qui permettent d'en tirer une conclusion.

[1] Burri, R. : Das Tuschverfahren. Jena (1909).

[2] Cfr. Burri, C. B. für Bakteriologie, Abt. II (1910).

[3] Lieske, R. : « Variabilität in Bakterien und Strahlenpilze ». Handb. der Pflanzen-Anatomie (K. Linsbauer) Lief. 8. (II, 1 A : 1-6).

Algologie.

L'affirmation de Lieske nous amène à signaler le point de vue plus prudent exposé par R. Chodat à propos des cultures pures de Chlorophycées. R. Chodat, dans son chapitre «Origine et notion de l'espèce» de son mémoire sur le genre Scenedesmus (p. 95), se demande s'il y a une limite, s'il y a réellement des unités systématiques qui méritent le nom d'espèces, de races ou de lignées pures ? L'auteur, plus loin, répond :

Ainsi, les diverses méthodes viennent concourir à nous donner de chaque espèce une expression générale, qui nous affermit dans cette théorie que, par sélection, on arrive bien réellement à des lignées pures qui sont (pratiquemment) stables. (p. 99).

En mettant entre parenthèses le mot pratiquement, l'auteur a voulu insister sur le caractère utile de ce point de vue ; car, une longue pratique de ces microorganismes lui fait dire (p. 98) :

Est-ce à dire, que nous pensons qu'il y ait réellement des lignées pures qui, pour l'ensemble de leurs caractères, seraient identiques? Nous ne l'oserions affirmer. Ce qui ressort de nos recherches, de nos expériences déjà de 30 années, est, que l'on peut, en partant de milieux naturels différents, obtenir plusieurs lignées pures qui biométriquement et physiologiquement nous paraissent identiques par rapport à des caractères arbitrairement choisis.

L'auteur fait alors judicieusement ressortir la superficialité de nos moyens d'enquête et de nos analyses distinctives, en face de la complexité d'une lignée élémentaire ; il oppose, aux potentialités manifestées par les organismes, leurs possibilités cryptomères, dont la manifestation, si nous pouvions la susciter, grandirait encore le nombre des lignées pures.

Quant aux mutations proprement dites, chez les Algues, signalons que R. Chodat[2], au cours de son enquête, dont la durée et la minutie ne seront pas dépassées de longtemps, n'a jamais pu observer de mutations ; il ne se refuse pourtant pas à les supposer et les considère comme le seul mode probable de la production de nouvelles races.

[1] R. Chodat : Scenedesmus. Etude de Génétique, de Systématique expérimentale et d'Hydrobiologie. Rev. d'Hydrologie, IIIme année, Nos 3-4, Aarau (1926).

Protistologie.

La difficulté qu'il y a de cultiver les protistes, en lignées pures, rend difficile l'estimation des observations faites par Haeker [1] sur les Radiolaires et Kofoïd [2] à propos du *Ceratium vultur*.

Il en est en de même pour les Trypanosomes [3], chez lesquels d'intéressantes expériences ont été faites concernant la création de races dépourvues de centrosome. En plus du fait que les auteurs ne sont pas partis d'individus isolés, ce qui n'est d'ailleurs guère possible, leurs observations sont faites après des passages sur les animaux, milieux incontrôlables au premier chef.

Mycologie.

Des mutations ont été signalées en mycologie, sans avoir toutefois fait l'objet de travaux systématiques. Ainsi, E. C. Hansen [4] a montré, il y a longtemps déjà, la mutation de levures hautes en levures basses.

Blakeslee [5] a découvert, par sélection du *Mucor genevensis*, un certain nombre de formes mutantes, dont beaucoup d'ailleurs retournent au type parental. Parmi elles, il remarque cependant deux de ces formes mutées qui sont permanentes.

René Vandendries [6] a observé, dans des cultures monosporées de *Coprinus*, des passages soudains de l'état haploïdique à l'état diploïdique ; il s'agit donc d'une mutation sexuelle chez un Basidiomycète, mutation qui fait apparaître une bipolarité sexuelle.

Watermann [7] a fourni, dans son étude de la mutation chez les *Penicillium* et les *Aspergillus*, des renseignements certainement fort intéressants sur la façon d'induire chez ces organismes des changements brusques, qu'il nomme mutations. Mais cet auteur ne fournit, celà est regrettable, aucun détail ni sur l'origine des races qu'il étudie, ni sur la permanence héréditaire des effets qu'il

[1] Haeker, V. : Die Radiolarien in der Variations- und Artbildungslehre. Zeitsch. f. Indukt. Abstammungs und Vererbungslehre. Vol. 2 (1909).

[2] Cité dans F. Doflein : Lehrbuch der Protozoenkunde.

[3] Chercher la bibliographie dans le compte-rendu fourni par : Dobel, Clifford : Journal of Genetics, Vol. II, No 3 (1912), p. 201.

[4] In Lindner Paul : « Ueber Mutationen bei Hefen und Schimmelpilzen ». Berlin und Wien. Urban u. Schwarzenberg (1922), 298 S.

[5] Blakeslee, Albert, F. : « Mutations in Mucors ». The Journ. of Heredity, Vol. XI, No 6 (1920).

[6] Vandendries, René : Bull. de la Soc. Roy. de Botanique de Belgique, T. LVIII, fasc. I (1925), p. 34.

[7] Watermann, H. J. : « Mutation bei *Penicillium glaucum* u. *Aspergillus niger* ». Zeitsch. für Gärungsphysiologie 3 (1913), p. 1-74.

observe ; aussi, rangerons-nous plutôt cette étude parmi celles des morphoses ou variations en fonction du milieu. Notre intérêt doit essentiellement se porter vers les travaux similaires au nôtre, c'est-à-dire ceux qui ont établi le pédigrée de leurs organismes. Historiquement, ces travaux sont les suivants :

1912. Schiemann : *Aspergillus niger.*
1916. Haenicke : *Penicillium* et *Aspergillus.*
1920. Brierley[1] : *Botrytis cinerea.*
1921. Burger : *Colletotrichum gloeosporioides.*
1922. La Rue : *Pestalozzia Guepini.*
1922. Stevens : *Helminthosporium.*
1923. Blochwitz : *Aspergillus.*
1925. Leonian : *Phytophthora.*

Ces auteurs ont tous signalé l'apparition de formes mutantes.

Il est hors de doute que Schiemann, Haenicke, Brierley, La Rue, Leonian, sont partis de cultures monosporées. Burger reconnaît avoir obtenu ses secteurs dans des cultures non inoculées à partir d'une spore ; mais le travail me fait croire que l'auteur aurait pu, en donnant de l'ampleur à son étude, rencontrer à nouveau des secteurs dans des cultures monosporées.

Tous reconnaissent l'existence de ces mutants. La Rue les signale comme malgré lui ; Leonian, tout en reconnaissant ces formes nouvelles, leur dénie le caractère de mutant, race nouvelle.

Quant à la permanence de la mutation, elle est clairement prouvée par Brierley qui dépasse 1000 générations. Schiemann a constaté une fixité pour 40 générations. Haenicke a trouvé des plus stables au moins stables parmi les mutations qu'elle a induites : aucune n'est cependant, selon elle permanente. Quant aux autres auteurs, ils n'ont pas développé l'investigation de ce côté-là.

Les uns les ont vu apparaître *spontanément*, comme Brierley son *Botrytis* à sclérotes blanches, comme Stevens chez *Helmintosporium* et Leonian chez *Phythophthora* leurs « saltations » ; Burger aussi a observé ses mutations dans des conditions normales. Par contre, chez les *Penicillium* et les *Aspergillus*, il a fallu l'intervention

[1] Brierley, W, B : « Some concepts in Mycology ». Trans. Brit. Myc. Soc., 6, (1919).
Brierley, W, B : « On a form of *Botrytis Cinerea* with colourless sclerotia ». Phil. Trans. Roy. Soc., Ser. B, 210 (1920).
Brierley, W. B : « On mutation of species ». Brit. Med. Journal, October (1922).
Brierley, W. B : « Discussion on the relation of plant pathology to genetics ». Report, of the Imperial Botanical Conference. London, July (1924).

d'excitants chimiques, comme en ont employé Schiemann et Haenicke, ou du temps (Blochwitz) pour réaliser les formes nouvelles. Peut-être la distinction n'est-elle pas très profonde, puisque les milieux que nous considérons comme normaux sont peut-être déjà des irritants pour les champignons. Le mode d'apparition des formes nouvelles est digne de retenir l'attention du généticiste-mycologue.

Schiemann inocule une spore et observe le développement depuis la germination jusqu'au développement total de la colonie. Quelques bouquets conidiaux épars et différents quant à la couleur, du reste, dénotent la présence du mutant. Au cours de mes propres cultures monosporées d'*Aspergillus ochraceus*, j'ai pu observer exactement la même marche du phénomène. Pour le reste des auteurs qui ont publié sur la mutation chez les Aspergilles et les *Penicillium*, les détails ne sont pas suffisants pour connaître les conditions où le mutant apparaît.

Dans les études de Stevens sur les *Helminthosporium*, de Leonian sur *Phytophthora*, de Burger sur les *Gloeosporium*, de Chodat sur les *Phoma*, de Brown sur les *Fusarium*, il est toujours fait mention de secteurs par lesquels se manifestent les « saltations ». En d'autres termes, les figures dessinées dans les colonies sectoriennes prouvent nettement que la mutation se manifeste dans une cellule hyphale, et que toute l'aire qui va dériver du développement de cet élément participera du même caractère que lui ; le secteur est la résultante d'une mutation de hyphes.

Les travaux que nous avons dit similaires au nôtre, en diffèrent cependant par leur moins grande rigueur dans l'analyse généalogique. Aucun d'entre eux n'a fourni ce que les Phoma nous ont montré dans cette étude: l'histoire génétique de cinq races nées à partir de la même souche. Aussi nous bornerons-nous à signaler les principaux résultats de ces auteurs dans les lignes qui suivent.

Dans le travail de Mademoiselle Schiemann [1], les conditions biologiques sont pleinement décrites et les précautions dont s'est entourée l'auteur, offrent une garantie sérieuse au point de vue génétique. Le problème que s'est posé l'auteur est le suivant : quelle est la fréquence de la mutation chez *Aspergillus niger* cultivé dans les conditions habituelles de culture ; peut-on augmenter le nombre des mutants en réalisant des conditions extérieures anormales ?

[1] Schiemann, Elisabeth : « Mutationen bei *Aspergillus niger* van Tieghem ». Zeitsch. f. Indukt. Abstammungs- u. Vererbungslehre. Bd. VIII, Heft 1, 2 (1912).

A la première question, les conclusions du travail répondent en disant que sur 178 colonies cultivées dans des conditions normales, 1 mutant apparaît, soit la proportion 0,5 % environ. Je ne puis, pourtant considérer comme normal un milieu qui a été additionné de $K_2Cr_2O_7$, même dans une faible proportion ($^1/_{2000}$; concentration limite à laquelle les conidies apparaissent encore). Sur 397 cultures qui furent soumises à des irritations chimiques, 8 mutations apparurent, soit environ le 2 %.

Le premier mutant de Schiemann est la race *A. niger* forma *fuscus* qui se maintient 40 générations. La coloration brun chocolat distingue cette race du type noir de *A. niger*; la sélection a été sans résultat dans la nouvelle race. Pas plus heureuse ne fut la sélection dans la deuxième race mutée sur le même milieu à base de $K_2Cr_2O_7$.

Cette race, appelée *cinnamomeus*, se distingue du type par le manque de pigment dans les conidies ; cette modification se trouvait être permanente. Par des cultures à une température élevée (45° C) l'auteur obtint une race mutante, *altipes*, caractérisée par des conidiophores élevés et, une autre race mutante douée d'une étonnante variabilité quant à la couleur et à la forme. Ce dernier type qui reçoit le nom de *A. niger proteus* montre dans le bouquet conidial une variabilité morphologique analogue à celle observable chez mon *A. ochraceus* γ.

A. Haenicke [1] publie en 1916 un mémoire sur les mutations des Périsporiacées. Par traitement au moyen de poisons, l'auteur réalise chez les *Penicillium* des modifications durables ; les toxiques, la température et les variations dans la concentration des sels nutritifs suffisent à produire chez les *Aspergillus* des formes mutées. De faibles concentrations suffisent : $^1/_{40.000}$ et même $^1/_{800.000}$. Chose curieuse, suivant les conditions, une irritation peut causer une mutation d'un type, puis plus tard, sur une autre espèce, voire sur la même espèce, provoquer une mutation d'un type différent. Les changements affectent en premier lieu la couleur du tissu conidien.

A la modification de la couleur des conidies, peuvent être liés d'autres caractères modifiés : réaction des milieux de culture, coloration des milieux, sensibilité aux poisons, ainsi que des changements morphologiques. Au point de vue de la durée des modifications, aux cours des générations successives, Haenicke a remarqué tous les types, depuis ceux qui perdent, à la première génération, le caractère acquis, jusqu'à ceux qui le conservent un grand nombre de générations. Aucun ne semble permanent selon Haenike.

Blochwitz [2], en triant des lignées pures du curieux *Aspergillus versicolor*, a obtenu une forme (mutation) bleu intense, qui s'est révélée stable pour 40 générations, en dépit des conditions les

[1] Haenicke, Alexandrine : « Vererbungsphysiologische Untersuchungen an Arten von *Penicillium* und *Aspergillus* ». Zeitsch. f. Botanik, 8 (1916), 225-343.

[2] Blochwitz, Adalbert : Eine algemeine Ursache spontaner Verlustmutation bei Schimmelpilzen. Berichte der Deut. Bot. Gesellschaft, 11 (1923), 205-208.

plus variées de culture. Blochwitz avait montré précédemment que chez la plupart des espèces d'*Aspergillus*, la couleur des conidies est généralement due à la combinaison du pigment contenu à l'intérieur de la cellule avec celui qui imprègne la membrane de la spore. La proportion des deux pigments varie avec l'âge des conidies, et selon les races employées. Dans le cas de l'*A. versicolor*, la coloration interne est bleue, celle de la membrane jaune ; chez la race mutante, le pigment de la membrane fait défaut.

L'auteur montre, par ses études, que les conidies extrêmement âgées et près de perdre leur pouvoir germinatif (9 ans), perdent en même temps la capacité de fournir un pigment. Les mêmes phénomènes sont observables dans la pigmentation du mycélium. L'âge semble également intervenir dans la capacité qu'aura l'organisme de fournir des sclérotes : une conidie très vieille pouvant donner naissance à un mycélium qui ne montrera point de sclérotes.

Dans une autre publication, Blochwitz [1] signale la propriété curieuse de l'*Aspergillus flavus* cultivé en commun avec le *Rhizopus nigricans*. Les conidiophores s'allongent jusqu'à la hauteur des sporanges, se ramifient régulièrement en corymbe et forment, au-dessus de la zone des sporanges, une zone de conidies. Or, Blochwitz, suivant sa théorie, que des *Aspergilli* finissent par acquérir les caractères que leur ont imposés des circonstances extrêmes maintenues suffisamment longtemps, prétend qu'après une culture prolongée avec *Rhizopus*, l'*A. flavus* doit fournir, même en culture pure, des conidiophores ramifiés. L'auteur a, en effet, obtenu pour plus de 10 générations des *A. flavus* à conidiophores ramifiés, même sans la présence du *Rhizopus*. Le problème que se pose l'auteur est de savoir s'il a affaire à des réels conidiophores ramifiés, ce qui ne s'est jamais trouvé chez les Aspergilles, ou bien s'il s'agit d'un simple mycélium aérien ramifié ?

Leonian, dans une étude sur le genre *Phytophthora*, a sélectionné et distingué 53 races ; il les distingue par des caractères tels que présence ou absence de gazon, de sporanges, ou vitesse de croissance, etc.

Dans la cinquième de ses conclusions, l'auteur dit que le phénomène de « saltation » a été soigneusement étudié, mais qu'aucune nouvelle espèce ou variété n'en est dérivée. Ces « saltations » ont, dit l'auteur, influencé la vitesse et le mode de croissance, la forme et la grandeur des sporanges, de même que la présence des oogones ; ces caractéristiques sont cependant trop instables et reversibles pour baser sur elles des espèces ou races nouvelles.

[1] Blochwitz, A. : Entstehung von *Aspergillus*- varietäten mit verzweigten Conidienträgern. Ber. d. Deut. Bot. Gesellschaft, Bd. 43 H. 3 (1925) 105-108.

[Leonian, Léon, H. : Physiological studies on the genus Phytophthora. American Journ. of Botany, Vol. XII (1925), No 7, p. 441.

[Stevens, F. L. : The Helminthosporium Foot-rot of wheat with observations on the morphology of Helmintosporium and on the occurence of saltation in the genus. Bulletin of State of Illinois (1922). Vol. XIV, article V

Burger, dans son examen du *Colletotrichum gloeosporioides*, a obtenu des secteurs dans ses cultures pures. Ce qui est intéressant est que l'auteur signale que les formes mutées sur des milieux artificiels, ressemblent considérablement à de petites espèces trouvées par lui dans la nature. Il assiste, en somme, à des mutations qui ont probablement eu lieu précédemment dans la nature.

Chez *Phoma*, j'ai observé moi-même que les mutations imitent régulièrement les types que le *Phoma* normal présente sous l'influence de conditions excessives.

Il est intéressant de comparer les résultats fournis par cette Mélanconiale à ceux obtenus pour la Sphaeropsidale (*Phoma*). Les secteurs se ressemblent parfaitement. Il est dommage que Burger n'ait pas donné plus d'ampleur à la partie généalogique de son travail.

Burger, O. F. : « Variation in Colletotrichum Gloeosporioides ». Journ. of Agricult. Research. Vol. XX, No 9 (1921), 723-736.

Aspergillus ochraceus

§ 1. ORIGINE DES SOUCHES DE DÉPART.

Les souches qui nous ont servi dans cette étude proviennent : l'une, de la collection de champignons du Dr W. B. Brierley, chef du département de mycologie à la Station de Rothamsted ; l'autre, nous a été envoyée de l'Institut Lister de Londres. Pour simplifier, j'appellerai les deux souches : *A. ochraceus* Rothamsted et *A. ochraceus* Lister. L'étude a été faite avec la souche de Rothamsted ; celle du Lister Institution nous a donné pleine confirmation des résultats obtenus avec la première, bien que les expériences aient été moins nombreuses avec la souche du Lister Institution.

La culture initiale de *A. ochraceus* Rothamsted a été faite sur un milieu de pomme de terre agarisé à raison de 1 1/2% ; la colonie, au bout de 10 jours de croissance en vase de Pétri, placé à l'abri de la lumière, à la température ordinaire, présente une apparence sectorienne du type suivant : le centre de la boîte, et la moitié environ du disque de la colonie, sont constitués par une végétation d'*A. ochraceus* type, c'est-à-dire par un mycélium interne, à peine visible, et un gazon d'appareils conidiens riches en spores jaune ochracées.

Le reste de la colonie, à l'exception d'un îlot marginal de végétation identique à celle que nous venons de décrire, est constitué par un mycélium interne nettement plus coloré en brun que la portion normale ; un gazon ras, comme fauché, émerge de cette portion ; les conidiophores sont clairsemés, courts, et le bouquet conidial pauvre. La teinte brune-rougeâtre est fournie par le mycélium interne bien plus que par le gazon aérien. De la portion normale, désormais appelée *A. ochraceus* α, on repique par inoculation ordinaire un tube de culture. Un second tube de culture est inoculé à partir de la zone sectorienne, appelée désormais γ.

Il était légitime de supposer que la culture fournie par l'Institut Lister était impure, et que les deux espèces venaient de se dissocier

dans la colonie sectorienne sus-décrite. Néanmoins, pour ne pas écarter définitivement l'hypothèse d'une mutation, il fut décidé de sélectionner des spores de la race γ et de la race α, d'inoculer ces germes, un par un, sur des milieux placés à l'abri de toute contamination possible et d'observer ce qu'il en adviendrait.

Méthodes de sélection des cellules-germes.

Il nous était nécessaire de partir de spores uniques, dont le développement avait pu être observé à partir de la germination. Cette condition nous obligea à faire usage des méthodes de triage suivantes :

1. La méthode de Burri, fondée sur l'emploi de l'encre de Chine, nous a servi au début de nos recherches. Nous l'avons ensuite abandonnée, car elle nécessite un temps d'observation qui nuit, quand il s'agit de multiples inoculations simultanées, à la bonne marche des opérations.

2. La méthode ordinaire des dilutions, combinée avec celle imaginée par Hansen pour le triage des levures, nous a fourni la majeure partie de nos cellules-germes. Les dilutions favorables s'obtiennent après un certain tâtonnement et l'on procède à l'inoculation de milieux de culture agarisés en vase Pétri. Le verre des vases doit être limpide et mince, de même la couche de milieu (tout au plus 5 mm.) ; en plus le vase doit être peu profond, de telle manière qu'une fois le couvercle placé et la boîte retournée sur la platine microscopique, fond contre objectif, couvercle contre condensateur, l'épaisseur du verre et du milieu ne soit pas supérieure à celle que peut fouiller un objectif No 5 (chercheur). Il faut, en effet, que l'on puisse vérifier la présence de cellules dans toute l'épaisseur du milieu. Les milieux, après leur inoculation, à partir d'une suspension de conidies ou de pycnospores, convenablement diluée, sont placés pour quelques heures, à l'étuve à 27° C. Au bout de 12 heures, un certain nombre de spores ont germé et, plaçant la boîte Pétri renversée sur la platine du microscope, on cherche avec l'objectif No 5, celles des spores qui ont un promycélium visible et non encore ramifié. Cette recherche est ardue ; tantôt les germes sont trop espacés, et l'on perd du temps à les repérer, tantôt ils sont trop rapprochés, et un développement ultérieur risquerait de confondre les mycélium de deux différentes cellules. On choisit alors parmi le nombre offert par la combinaison des dilutions et du nombre de gouttes versées dans chaque boîte, celle de ces dernières qui est la plus propice au triage. Une cellule en germination y étant repérée, on marque par un point à l'encre de Chine le lieu d'où l'observation verticale permet de retrouver la cellule. On élève le tube du microscope pour pouvoir dessiner à l'encre

rouge sur le verre un cadre de cm. 0,5 autour du point noir ; ce dernier est alors gratté au scalpel ; ensuite on contrôle si, dans l'aire et l'épaisseur du secteur découpé par la fenêtre rouge, la cellule en germination est bien seule. On peut répéter l'examen jusqu'au moment où la petite colonie atteindra les confins de la surface circonscrite. Il faut alors, de préférence, même avant, ouvrir la boîte et fendre la couche d'agar en suivant les lignes rouges au moyen d'un fin scalpel stérile et détacher le parallèlipipède contenant la colonie pour le placer sur un milieu de culture stérile.

Une troisième méthode de triage a été employée : c'est celle qui fait usage de l'appareil imaginé par mon ami, M. Dickinson [1]. Le principe sur lequel est fondé l'« Isolator » est le suivant : une fine aiguille de verre se meut dans les trois directions de l'espace, sous le contrôle même d'un puissant objectif. Approchant cette aiguille de la surface d'une gelée fraîche d'agar, disposée horizontalement sur la platine microscopique, on réalise entre l'aiguille et le film liquide qui couvre toute gelée fraîche d'agar, une colonne capillaire d'eau. La méthode consiste alors à déplacer cette colonne liquide, qui peut contenir un ou quelques germes disposés intentionnellement, en un point quelconque de la gelée. En coupant, et rétablissant plusieurs fois le contact capillaire, on finit par déplacer, dans une partie marginale de la gelée, une cellule unique qu'on pourra prélever de cette zone stérile, sans crainte de contamination. M. Dickinson lui-même, a aimablement opéré un triage pour moi.

Des spores furent donc triées, par les méthodes sus-décrites, des souches α et γ. Ces spores furent inoculées dans des bouteilles à fond plat, utilisées par les bactériologistes pour la production de masses microbiennes. L'emploi de ces flacons, hermétiquement clos, s'est révélé très adéquat à nos recherches ; la surface y est suffisante pour la colonie et la fermeture contre les infections du dehors est parfaite. Les descriptions qui vont suivre sont toutes établies à partir de cultures monosporées.

§ 2. CARACTÈRES QUI DISTINGUENT LA RACE *A. ochraceus* α DE *A. ochraceus* γ :

1. Caractères culturaux :

Sur le milieu *Coonagar*, que nous avons choisi comme type, la principale différence entre les deux aspects culturaux, est la hauteur du gazon.

[1] *Dickinson*, Sydney, ?

Le gazon atteint 5 à 7 mm. pour α, tandis que γ atteint à peine 3 mm. La couleur de la colonie distingue les deux formes ; cependant, ce caractère varie avec la nature du milieu et sera décrit plus loin. La concentration en appareils conidiens est grande chez α, à tel point que les têtes fertiles des conidiophores se touchent les unes les autres. Au contraire, dans les cultures de γ, ce n'est qu'au centre qu'il y a concentration ; le reste de l'aire coloniale est clairsemé de conidiophores peu fertiles (voir fig. 2). Les conidiophores dessinent dans les colonies de la race α une série de zonations concentriques très nettes qui n'existent nullement chez la race γ. Les différences entre les deux races sont exagérées par la culture sur le milieu liquide acide de Raulin.

Le type α fournit sur ce milieu une végétation en forme de grosse membrane pelucheuse, toute piquée de conidiophores élevés ; la couleur générale est ochre ; le caractère saillant, est le relief membraneux en grumeaux. La végétation de γ est au contraire caractérisée par une membrane de relief vermiculaire, presque glabre et de couleur beige-rosé ; les conidiophores y sont quasi invisibles et constituent un gazon ras (voir fig. No 6 pl. II).

Le milieu de Raulin donne des cultures si distinctes, que nous avons, par inoculation des deux races dans un même flacon, réalisé des tissus mosaïques ocres grumeleux et vermiculaires beige-rosé. La différence entre deux flacons de α et de γ, est visible déjà au bout de la première semaine. Plus tard, il arrive parfois que le type γ a une tendance à fournir des conidiophores plus nombreux ; les couleurs convergent aussi ; seule la structure du pseudo-parenchyme reste très distincte. La figure No 6 pl. II représente des colonies âgées de 13 jours.

2. Caractères anatomiques.

Le mycélium de γ ne se distingue du mycélium α que par la présence, à l'intérieur des cellules, d'un pigment brun à rouge sang, condensé au niveau de corpuscules de forme irrégulière ; ces corps, plus ou moins nombreux, sont visibles dans les cellules de la race γ. On ne les observe pas chez α.

Les conidiophores de γ apparaissent beaucoup plus épars et sont deux fois plus minces environ que ceux de α. Chez une culture âgée, nous avons mesuré pour α_M les diamètres des conidiophores 9 à 10 μ. Pour une colonie γ de même âge : 4 à 5 μ. Pour la race α

le bulbe terminal du conidiophore, pseudo-columelle, est bien constitué, globuleux (voir fig. No 2). Pour la race γ il peut exister sous la forme normale ; mais le plus souvent il est atrophié, réduit, ou même à peine plus large que le conidiophore (voir fig. No 2).

Fig. 2. — Appareil conidial de l'*A. ochraceus* α à gauche, γ à droite.

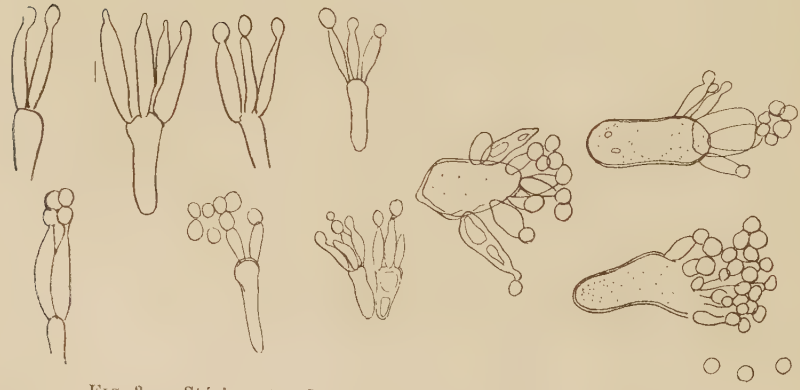


Fig. 3. — Stérigmates de l'*A. ochraceus* α à gauche, γ à droite.

Pour la race α on a généralement des stérigmates minces allongés, portant deux stérigmates de second ordre où sont attachées les conidies (voir fig. No 3). Les stérigmates chez γ sont tout à fait irréguliers et variables ; le plus souvent épais et portant directement les spores (voir fig. No 3).

Un dernier caractère distingue la race γ de la race α ; cette dernière produit en abondance des corémies, résultant de l'accolement de plusieurs conidiophores ; il arrive souvent aussi que les conidies couvrent les corémies qui n'apparaissent plus que comme un amas cylindrique de spores ; le bouquet conidial peut aussi être modifié et prendre la forme d'une bobine fixée par sa portion centrale mince. Ces figures sont montrées par la race α. Il n'y a pas de différence entre les spores de α et de γ.

Caractères de croissance.

Nous avons mesuré comparativement la vitesse de croissance en diamètre pour les races α, α_M et γ, sur différents milieux.

Sur un milieu riche en azote, constitué par du bouillon de peptone agarisé, les trois races ont une croissance en diamètre sensiblement égale, ainsi que le prouvent les chiffres du tableau suivant. Si l'on substitue à l'azote organique, une source d'azote inorganique, tartrate d'ammonium, on constate un développement colonial plus rapide, mais égal pour les trois races.

Tel n'est pas le cas, si nous cultivons les trois races sur un milieu constitué par une dispersion d'amidon soluble (3%), solidifiée par de l'agar. Sur ce milieu riche en hydrates de carbone et pauvre en azote, on remarque que α et α_M croissent avec la même vitesse, tandis que γ ralentit nettement son développement colonial (voir tableau).

Milieu		*Croissance en mm.* 7e	15e	19e	23e jour
Bouillon peptone agarisé	α	9	23	29	38
	α m	9	23	29	36.5
	γ	9.5	21.5	29	31
Coonagar où l'asparagine est remplacée par du tartrate d'ammonium	α	12	34	44.5	55
	α_M	15	34	44	50
	γ	12	31	41	50
Amidon-agar 3%	α	8	27	35	50
	α_M	7	25	35	45
	γ	6	12	15	18

Cette indication nous a engagé à comparer les croissances de α_M et γ sur des milieux Coonagar, où le maltose a été remplacé par

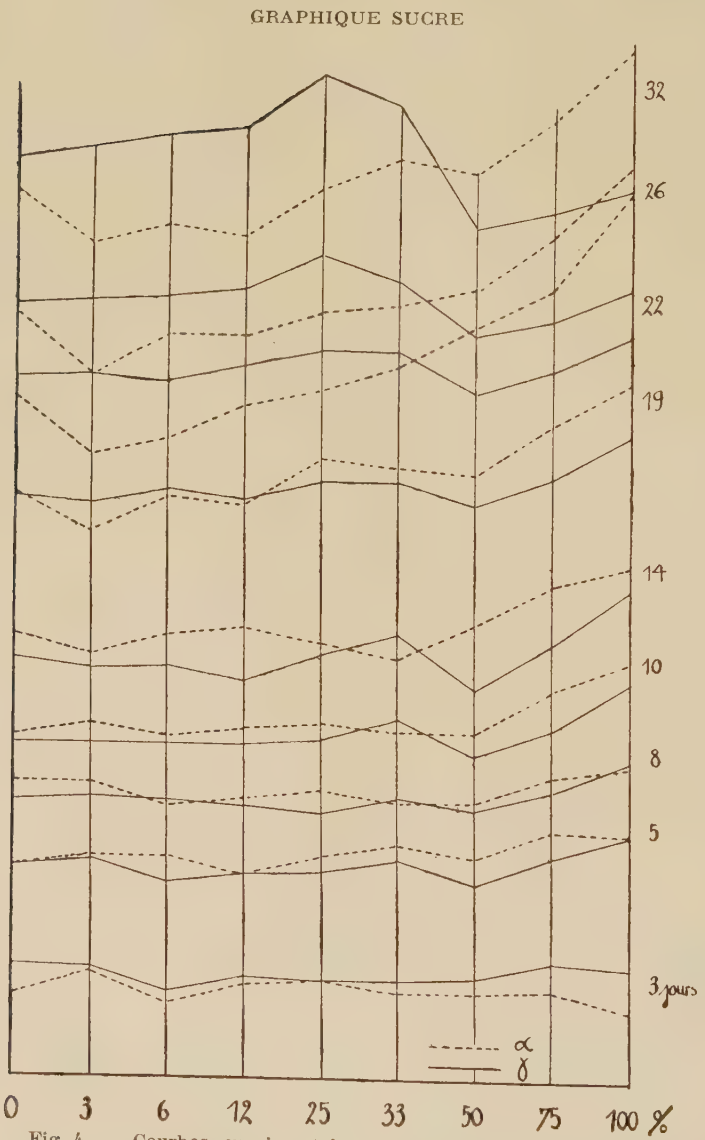


Fig. 4. — Courbes exprimant les vitesses de croissance en diamètre des races α et γ de l'*A. ochraceus*, sur milieu Coonagar où la teneur normale en maltose varie suivant le % indiqué.

différents sucres. Ainsi qu'on peut s'en rendre compte par les chiffres fournis au tableau suivant, la croissance de α_M et γ est à peu près la même sur ces différents sucres ; γ a cependant un léger retard (tableau p. 60).

Sur des milieux Coonagar qui diffèrent par la quantité de maltose (de 0% à 100% de la quantité prévue par la formule de Coon), nous voyons par le graphique de la figure 4 que, quelle que soit la concentration du sucre, α et γ augmentent semblablement leur diamètre ; γ manifeste cependant un optimum de vitesse d'extension coloniale pour 25% de la quantité de maltose.

Nous avons donc vu que ni la nature, ni la concentration des sucres, ne permettent de distinguer les deux races par la croissance. Un milieu riche en azote n'est pas plus différentiel.

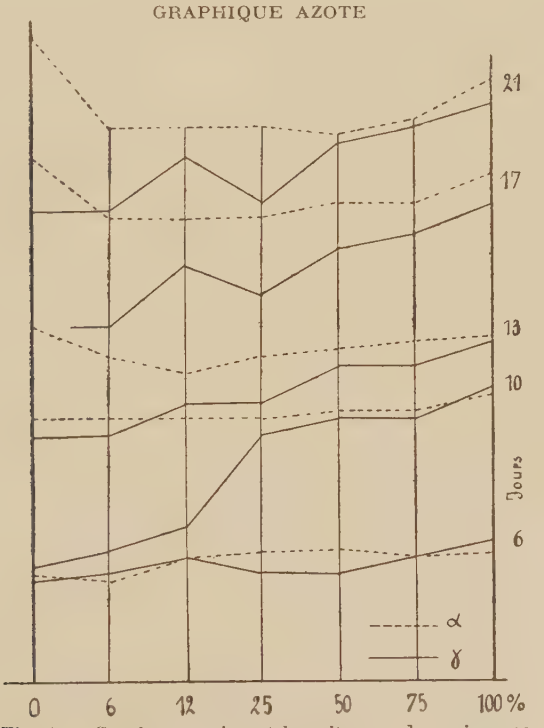


Fig. 5. — Courbes exprimant les vitesses de croissance en diamètre des races α et γ de l'*A. ochraceus*, sur milieu Coonagar ou la teneur normale de l'Asparagine varie suivant le % indiqué.

Mais la carence de nourriture azotée, même en présence d'une nourriture normale pour le reste, affecte beaucoup plus la croissance en diamètre de γ que celle de α et α_M; la fig. No 5 montre en effet, comment en l'absence d'asparagine, la croissance de γ est retardée sur celle de α_M.

Arabinose				*Xylose*				*Mannose*				*Jours*
α		γ		α		γ		α		γ		
8	9	10	9	8	7.5	7	7	7	8.5	6	7	4e
19	20	18	17.5	17.5	16.5	16	14.5	18	17	15	15	7e
21	27	25	24.5	23	21	22	22.5	24	25	21	23	9e
32	33.5	28.5	29	28	28	27	26.5	31.5	29	25	25.5	12e
35	39	32	32	32	33	30	30	35	35	29	31	14e
44	46	37.5	39	37.5	38.5	36	32.5	42	40	35.5	34	18e
54	52.5	47	48.5	43	45	44		50	47	42	41	23e
58	59	54	56	54	50	49		60	60	47	47	26e
60	60	60	60	54	54	52.5		64	63	50	50	30e
	—	67	68	—	—	57		—	—	56.5	57	37e

Galactose				*Lévulose*				*Glucose*				*Jours*
α		γ		α		γ		α		γ		
8	10	5	7	10	8	10	7	8	7	8	7	4e
15	18	12	13	18	17.5	19	17	18	17	16.5	14.5	7e
23	25	17	20	25.5	24.5	26.5	24	24.5	24.5	24	21.5	9e
26	30	21	24	29.5	30	30	29.5	28.5	30.5	27.5	26	12e
31	35	25	28	35	35	34	32	34	35	31.5	30	14e
36	40	31.5	30	40	42.5	39	40	40	45	35.5	35	18e
42	47	39	34	52	51	47	47	50	53	44.5	43	23e
51	52	46	36	60	59	54	53	59	60	50	48	26e
58	55	50	—	65	65	56	55	63	65	53.5	52.5	30e
—	—	60	—	—	—	61	61	—	—	60	59	37e

On peut résumer, en disant que la race γ se distingue de α par son exigence en nourriture azotée ; α peut se contenter de moins d'azote pour produire une végétation plus riche. La faculté d'absorber les groupes azotés ou de les assimiler a été amoindrie dans la race γ.

Caractère de couleur.

Les colonies de la race α sont d'un beau jaune ocracé à cause de l'abondance des conidies de cette teinte ; le mycélium interne est incolore. D'autre part, nous avons dit que la couleur rouge à rouge brique des colonies de la race γ, est due aux corpuscules pigmentés qui sont dans les cellules des hyphes internes ; le jaune des conidies ne joue que peu de rôle, vu surtout la pauvreté en conidiophores.

Sur le même milieu Coonagar, α est jaune ocre, γ est rouge. En fait, il ne s'agit que de la même matière colorante, qui fonctionne comme indicateur, rouge en milieu alcalin, jaune en milieu acide. Artificiellement, on peut jaunir le rouge au moyen d'une goutte d'acide et brunir le jaune grâce à une base. Cette expérience est confirmée par les résultats suivants : si on cultive sur un milieu Coonagar, où l'asparagine a été remplacée par du tartrate d'ammonium, la race γ, elle, devient rouge comme à l'ordinaire ; mais α, lui aussi, rougit sur ce milieu et montre une pigmentation intracellulaire. Une mesure de la réaction du milieu de culture montre que celui-ci est devenu fortement alcalin.

Si, au contraire, on cultive α et γ sur un milieu Coonagar à base de nitrate d'ammonium, au lieu d'asparagine, α devient jaune ocracé comme d'habitude, et γ développe une colonie jaune au lieu de rouge. La mesure de la réaction indique que le milieu est devenu fortement acide. On peut supposer que l'absorption du cation ammonium a laissé dans le premier type de milieu, l'anion tartrate et dans le second type l'anion nitrate. Quel que soit d'ailleurs le procès du métabolisme, il n'en reste pas moins que l'alcalinisation du milieu externe suffit à faire apparaître la teinte rouge à l'intérieur des cellules hyphales de α, tout comme l'acidification du milieu externe suffit à inhiber l'apparition de la couleur rouge à l'intérieur des cellules hyphales de γ.

Si nous étudions la production des pigments, nous verrons que sur le milieu amidon-agar, donc riche en sucre et pauvre en azote, α demeure jaune et γ devient rouge-sang. Il ne paraît pas que la présence d'azote soit indispensable à l'apparition du pigment. Sur le milieu pomme de terre-agar, les différences sont beaucoup moins marquées, γ devenant un peu plus brun que α. Nous attribuons cette atténuation de la couleur à l'effet que peuvent exercer les protides de ce milieu sur sa propre réaction.

Le sucre étant, par fermentation, une source d'acidité, nous avons noté la couleur des colonies développées sur des milieux Coonagar où la quantité de maltose varie. La couleur rouge apparaît dès la concentration relative 25% (absolue 0,9 ‰) et s'intensifie jusqu'à la concentration relative 100% ou absolue 3,6 ‰ ; en milieu Coon liquide, le rouge apparaît à 6% ou 0,23‰, est maximal à 25% ou 0,9 ‰, pour diminuer et même virer au jaune à 100% ou 3,6 ‰.

Nous dirons, pour conclure, que le caractère de coloration ne tient pas à la présence ou l'absence de pigment, mais bien à la réaction intracellulaire propre à chaque race. Pour un même milieu, γ réalise une réaction intracellulaire nettement plus alcaline que α.

§ 3. GÉNÉALOGIE.

Dans le paragraphe « Origine des souches de départ », nous avons considéré provisoirement le secteur obtenu comme la résultante d'une culture impure. Au cours de notre étude généalogique, nous constatons qu'une succession de générations dérivées d'une culture monosporée de la race α, conservent leur type inaltéré ; même dans des cultures âgées de plus de 3 mois, la colonie est demeurée homogène ; cette période a été augmentée jusqu'à 7 mois sans changer les précédents résultats.

Pour la race γ, une succession de *jeunes* générations, dérivées d'une culture monosporée, a manifesté pour plus d'une année une constance parfaite dans tous les caractères.

Mais, si nous examinons les colonies issues de l'inoculation d'une spore unique dans les bouteilles plates à milieu Coonagar, on observe après 3 mois de culture homogène du type γ, dans la zone marginale de la colonie, une petite tache jaune ocracé, constituée par un îlot de végétation du type α : conidiophores 2 à 3 fois plus élevés, abondances des conidies, etc. Cet îlot n'est, à vrai dire, constitué que par quelques conidiophores réunis en bouquet ; cette zone ne s'étend d'ailleurs pas, la forme nouvelle ne propage pas sa végétation et ne constitue pas en général de secteur. L'objection d'infection est facilement réduite par les arguments suivants : 1. Aucune infection ne s'est déclarée sur les 64 cultures à partir d'une spore unique, faites dans les bouteilles plates. 2. La mutation α Mutant, s'est réalisée dans 7 bouteilles de cultures γ. Il y a donc peu de chance, pour que 7 infections se soient réalisées, toutes par le même agent et, exclusivement dans les bouteilles γ, alors que les flacons du type α et γ étaient mélangés dans la même armoire.

On ouvre alors la bouteille [1] pour toucher avec le fil de platine la zone mutée, à l'exclusion de tout autre ; ceci est facilité à cause de l'élévation des conidiophores de cette zone. La souche qui résulte de cette transplantation sur un milieu frais, est appelée α Mutant.

[1] Ces flacons doivent avoir un goulot assez large pour permettre la manipulation du fil de platine sur la colonie.

Le premier devoir est de soumettre au triage par spores isolées ce matériel α_M.

24 cellules conidies de α_M furent isolées, puis placées chacune sur milieu Coonagar dans des bouteilles plates. L'examen de ces colonies dure 72 jours, pendant lesquels on note un développement et une apparence culturale de α_M identiques à ceux observés précédemment pour α. Toutes ces colonies sont identiques ; le seul caractère qui fut différent de α fut la zonation concentrique ; certains α_M ne la montrent même pas du tout, se rapprochant par ce trait de leur souche-mère, γ, tandis que d'autres α_M étaient, les uns passablement, les autres parfaitement zonés.

Ce caractère de zonation n'est qu'un détail, en regard de la similitude montrée par α_M et α (voir à ce propos les vitesses de croissance). Aucune de ces colonies monosporées de α_M n'a montré le moindre îlot sectorien au cours d'une période dépassant 4 mois. Un triage fut alors opéré à partir d'une des premières cultures monosporées de γ, qui n'avait point montré de secteur ; 16 conidies furent isolées et cultivées dans des bouteilles plates à milieu Coonagar.

Plusieurs de ces colonies fournirent alors, après un temps prolongé, des îlots de α_M.

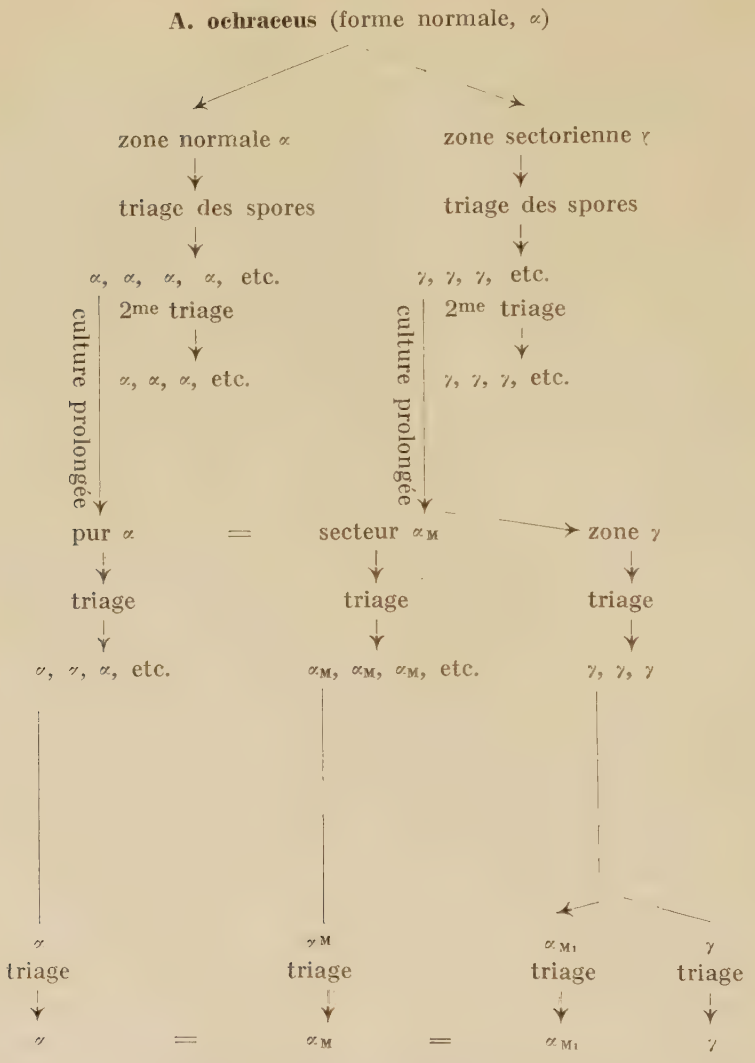
On s'étonne peut-être, que la proportion des mutants ne soit pas signalée. L'observation suivante montre qu'en principe, toutes les colonies de γ sont appelées à fournir par mutation α_M.

Lors d'une sélection de spores de γ, nous avions inoculé ces germes sur des milieux de culture Coonagar en tubes ; 2 mois après, en examinant ces mêmes tubes, nous trouvions que *tous* avaient fourni des îlots sectoriens sur la partie inférieure du milieu, qui s'était recroquevillé par dessication.

Cette dernière expérience montre clairement que, dans les tubes, où l'épuisement du milieu est plus vite atteint, la mutation affecte le 100% des colonies, tandis que dans les cultures en bouteilles plates, plus riches quant au volume de milieu, le 2% des colonies est affecté.

Une généalogie détaillée des races α et γ de l'*Aspergillus ochraceus* nous permet de fournir le schéma suivant, qui résume nos observations faites à partir de plusieurs centaines de cultures.

Le schéma précédent montre que l'*Aspergillus ochraceus* fournit, dans des conditions que nous n'avons pu définir, une race dite γ ;



en effet, la race γ s'est trouvée régulièrement mélangée dans les cultures dites pures de l'*A. ochraceus* ; mais nous n'avons pas pu réaliser expérimentalement [1] le passage d'une forme α issue d'une spore unique dans la forme γ ; cela provient sans doute d'une insuffisance, soit dans le nombre, soit dans les conditions d'expérimentation ; car, la forme γ qui s'est trouvée mêlée à la forme α ou nor-

[1] Un cas s'est pourtant manifesté et a donné lieu à la colonie sectorienne figurée à la planche 1; mais nous ne l'avons jamais pu réaliser une seconde fois.

male, dans différentes souches d'*A. ochraceus*, de provenances diverses, doit, jusqu'à preuve du contraire, dériver de la forme normale ; il est difficile d'imaginer que la même contamination ait affecté la culture pure de Washington et celle de Londres.

D'autre part, la constance avec laquelle la forme γ a fourni par mutation des retours parfaits au type α, nous engage encore plus à considérer ces deux formes comme la manifestation d'un dimorphisme profond d'une seule et même espèce. Nous ne connaissons que les conditions qui président au retour du secteur vers l'espèce mère. Il n'y a pas là un retour progressif de l'ensemble de la population issue du mutant ; le retour est brusque, absolu, et n'affecte qu'une fraction de la descendance mutée. C'est ce qui nous engage à employer le terme mutation pour les observations que nous venons de décrire.

Il est intéressant de signaler le travail de Kita sur l'*A. ochraceus* et de comprendre dans quel embarras a dû se trouver l'auteur japonais qui tenta de classifier les formes de l'*A. ochraceus* sans tenir compte de leur généalogie.

G. Kita, [1] en étudiant les champignons qui apparaissent au cours de la fermentation protéolytique voulue du poisson *Gymnosarda affinis* (production du Katsuobushi), a isolé 4 races d'*Aspergillus ochraceus* :

A. ochraceus 1
A. ochraceus 2.
Onikipilz 3.
A. melleus 4.

« *Oniki* » est une race d'*Aspergillus ochraceus* qui joue le rôle principal dans la fermentation des semences de Soja. Kita a cherché à caractériser ces races par leurs propriétés fermentatives surtout amylolytique ; liquéfaction de la gélatine, titration de l'acidité obtenue dans les milieux de culture à base de riz. Les différences sont faibles et conduisent l'auteur aux conclusions suivantes :

Parmi 4 races d'*A. ochraceus*, *A. ochraceus* W se développe particulièrement lentement, avec un appareil conidial médiocre.

A. melleus a le plus grand pouvoir diastasique et protéolytique. Ces 4 races se laissent distinguer encore par les couleurs, la faculté de produire des sclérotes, etc..

L'auteur, ne sachant pas si ces caractéristiques sont suffisantes pour élever ces races à la dignité d'espèces, les range toutes sous le nom générique de *A. ochraceus*.

[1] G. Kita. — Einige japanische Schimmelpilze. II. Mitteilung. Ueber die Aspergillusarten aus « Katsuobushi » und Vergleichung von vier *A. Ochraceusartigen* Pilzen. (Aus dem Technischen Institut der Kaiserl. Universität zu Tokio) Centralblatt f. Bak. II. Abt. B. 41. 351-363 (1914).

Phoma Alternariacearum

§ 1. SOMMAIRE DE LA GÉNÉALOGIE

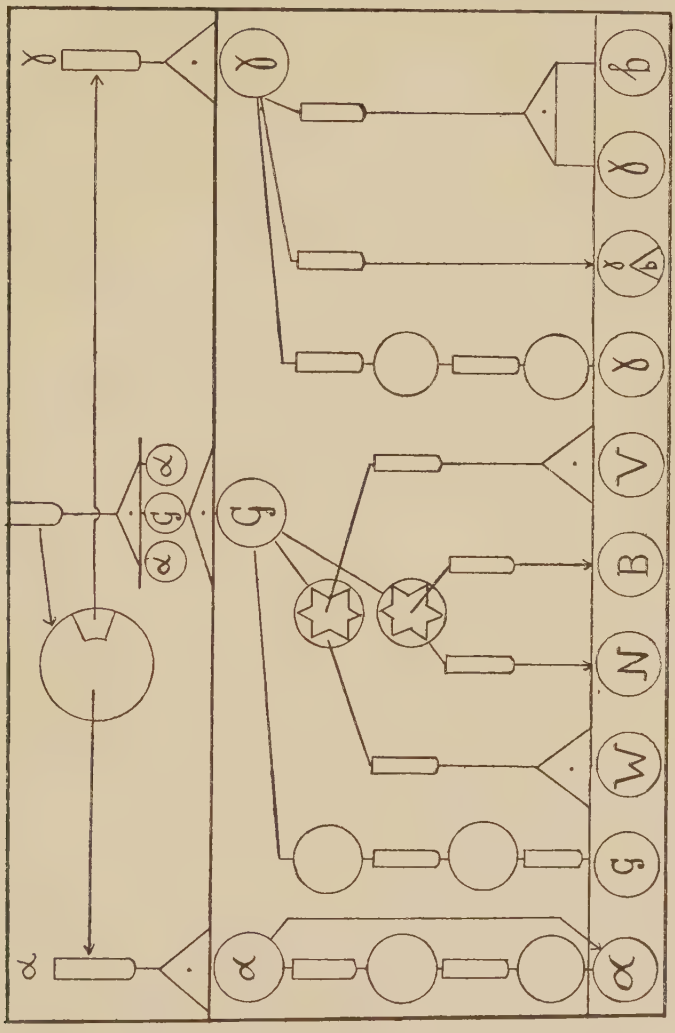
La culture d'une souche de *Phoma alternariacearum*, Brooks et Searle, provenant de la collection de champignons de l'Institut Lister, à Londres, a fourni une colonie d'apparence dite normale ; nous avons donné le nom de α à ce type de végétation resté semblable à lui-même pendant 13 mois de culture sur des milieux variés.

Cette race α a fourni un secteur défini, que nous avons isolé de la forme mère α ; nous avons appelé γ cette race née par mutation de secteur ; cette race γ est demeurée, pendant 13 mois de culture, semblable à elle-même et distincte de α. Au cours d'une sélection des spores de α, nous avons isolé une forme intermédiaire entre α et γ, la race G, ainsi que nous l'avons nommée. Elle se trouve être à mi-chemin, par ses caractères, de α et γ, et persiste, pendant plus de 13 mois de culture, semblable à elle-même. Par mutation de secteur, elle donne naissance à une forme amoindrie, la race V ; cette dernière, à son tour régénérera, par secteur, une race plus complète W qui, tout en se rapprochant de G, ne lui est pourtant pas identique. V et W persisteront plus de 8 mois, semblables à eux-mêmes, et distincts entre eux. Par un procès sectorien, calqué sur celui que nous venons de décrire, la race G fournit deux autres souches, B, analogue à V, et N, analogue à W. Ces souches n'ayant jamais été sélectionnées par la méthode des spores uniques, nous ne les élevons pas à la dignité de races et nous réservons notre opinion quant aux résultats fournis par leurs cultures.

La race γ, après une période de stabilité, fournit à partir de cultures âgées une forme nouvelle appelée b ; cette forme est apparue au cours d'une sélection des spores de γ et aussi par mutation sectorienne au cours d'une culture de γ. Cette race b manifeste la tendance d'un retour au type α, sans pour cela que la race produite puisse être confondue avec celle de α.

Toutes ces études sont basées sur des cultures monosporées, c'est-à-dire dérivant d'une colonie issue d'un germe unique. On

trouvera, à la figure 8, un schéma généalogique qui résume ce qui vient d'être dit ; ces affirmations trouveront dans les para-



Fig, 8. — Schéma généalogique des 5 races issues par mutation de le souche α du *Phoma alternariacearum*. Les triangles munis d'un point représentent des triages à partir de spores uniques. L'alternance des tubes et des vases Petri signifie une culture fréquemment repiquée, une ligne droite signifie une culture prolongée sur le même milieu.

graphes suivants les documents nécessaires à leur justification et la description des expériences indispensables à leur vérification.

Nous allons donc décrire successivement les six races α, G, γ, V, W et b en choisissant, comme milieu-type, le milieu de culture composé par Coon[1]. Les colonies se sont développées sur le milieu de Coon solidifié par de l'agar-agar à raison de 1 1/2 % ; pour simplifier, nous appellerons dorénavant Coonagar le milieu-type auquel il faudra rapporter toute description faite sans mention d'un milieu particulier.

L'organisme, qui a servi de souche, pour l'étude sur le *Phoma*, a été décrit par F. F. Brooks [2] et G. O. Searles, dans un mémoire sur les maladies des tomates. Parmi différents saprophytes et parasites du fruit de tomate, les deux auteurs ont reconnu *P. alternariacearum* comme espèce nouvelle ; le nom spécifique provient du fait, que les auteurs ont considéré les hypnocystes en forme de massues, comme des spores aériennes du type *Alternaria*. Or, nous verrons qu'elles sont aussi bien dans le mycélium interne que dans le gazon et que ce sont des figures qui apparaissent en fonction des substances nutritives présentes.

Certains auteurs sont même allés jusqu'à prendre pour un cycle vital du *Phoma Alternaria* les phénomènes de convergence présentés par les hypnocystes de *Phoma* et les spores d'*Alternaria*.

§ 2. RACE α

Origine :

Le 9 II. 1925, un milieu de culture pomme de terre-agar est ensemencé à partir d'une culture en tube de *Phoma alternariacearum* Brooks et Searle, sur milieu malt-agar. Le 13. II. 1925, on inocule à partir du tube du 9. II. 1925 un milieu de culture en vase ou boîte de Pétri. La colonie qui en résulte, première colonie sectorienne, sert de source pour inoculer le 13. III. 1925, la partie de la portion restée normale (c'est-à-dire non sectorienne), un milieu de culture Coonagar en tube. C'est de ce tube du 13. III. 1925 qu'on sélectionne le 4. IV. 1925, 21 spores de la race α. Les 21 colonies qui en résultent, toutes identiques, servent de matériel pour la description qui suit.

[1] Coon G. H. : Journal of Agricultural Research (1916). Composition du milieu $MgSO_4$, 10cc. de sol. gr. 2,466 in 50cc. aq. dest; KH_2PO_4, 50cc. de sol. gr. 1,36 in 50cc aq. dest; Asparagine. 10 ccm. de sol. gr. 0.665 in 25cc. aq. dest; Maltose, 50cc. de sol gr. 3,6 in 50cc. aq. dest; Eau distillée, 880cc. et Agar gr. 1,5.

[2] Brooks. F. F; and G. O. Searles. « An Investigation of some tomato diseases ». Transact. Brit. Myc. Soc. 1920. (173-197).

Morphologie coloniale et anatomie de la race α sur milieu Coonagar.

Le mycelium aérien est toujours présent, de couleur grise, variant souvent jusqu'à beige et vert-sale ; ce virage a lieu avec le vieillissement de la colonie. La hauteur du gazon varie : tantôt une laine basse, égale partout, tantôt un gazon pyramidal, tantôt un mouchet ou même un plumet constitué par une série de hyphes hyalines agrégées ; ce faisceau peut atteindre 15 mm. de haut. Ces états ne sont pas nécessairement exclusifs les uns des autres ; ils peuvent être mélangés.

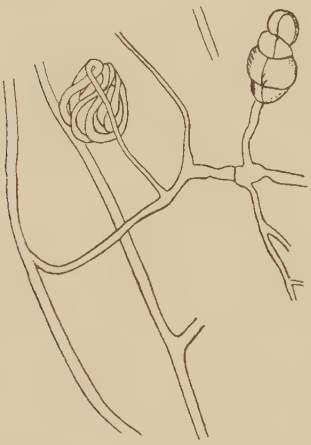


Fig. 9. — Hyphes et hypnocyste muriforme. Culture du *P. alt.* α, 22 jours agé.

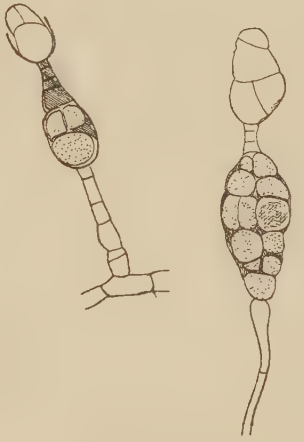


Fig. 10. — Même colonie qu'à la fig. 9 ; hypnocystes en massues.

Le mycélium aérien est composé, au début, d'un enchevêtrement de hyphes hyalines, minces, croisées ; parfois une ou quelques grosses pycnides roses sont suspendues dans le lacis ; cela ne se trouve qu'au centre de la colonie, dans le mouchet. Au bout d'un mois et quelques jours, le mycélium aérien montre les figures suivantes : des hypnocystes en forme de massue et d'autres hypnocystes de constitution plus simple (voir fig. 9 et 10). Les hypnocystes sont des appareils constitués par l'agrégation de plusieurs cellules pigmentées ; la forme la plus habituelle est celle d'une massue ; des appareils ont aussi la forme d'un glomérule de cellules pigmentées ; cette boule est suspendue à deux hyphes latérales. Les hypnocystes sont presque toujours foncées, de jaune olive à

brun noir, et remplies de matières de réserve hydrocarbonée ; le glycogène, qui en constitue la majeure partie, réparti d'une façon homogène dans le protoplasme, est ordinairement accompagné d'un pigment accessoire qui donne à ces cellules une couleur vert-olive ; le glycogène est facilement mis en évidence par la teinture d'iode. La graisse se trouve sous forme de granules de toutes les grandeurs ; l'acide osmique les décèle facilement : ils ne contribuent pas à donner une couleur aux cellules. Les hypnocystes naissent parfois directement d'une cellule d'une hyphe, à articles allongés, tantôt, et le plus souvent, d'un élément de filament à cellules courtes et épaisses. Le mycélium est, en effet, partagé en

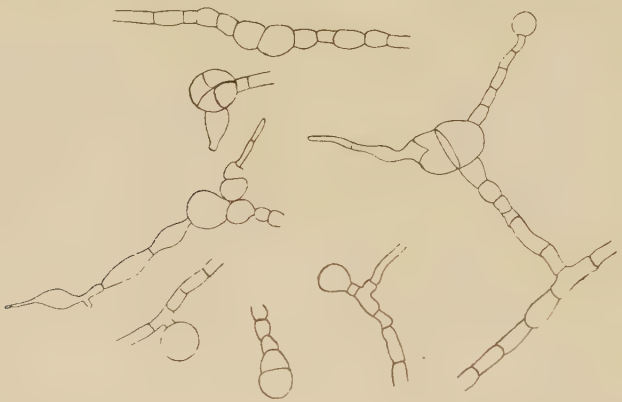


Fig. 11. — Ebauches d'hypnocystes dans une culture *P. alt. α.*

hyphes à articles minces et allongés et en hyphes à articles épais et courts.

On trouve encore des figures auxquelles nous avons donné le nom d'hypnocystes en chaînette oïdium ; ces figures sont le plus souvent constituées par des articles hyalins, disposés comme une chaînette de cellules oïdium. Il arrive aussi qu'une cellule du centre de la chaîne s'enfle, puis se divise pour constituer un glomérule ; ces dernières cellules sont fréquemment pigmentées, mais jamais avec l'intensité des formes parfaites de l'hypnocyste en massue (voir fig. 11). Ces figures, qui ne sont en réalité que des ébauches d'hypnocystes, se trouvent généralement différenciées sur le réseau des hyphes pigmentées et volontiers au voisinage des pycnides ;

dans les mêmes régions, on observe les hypnocystes de formes les plus diverses.

Dans le mycélium aérien d'une culture âgée de la race α sur milieu Coonagar, on voit, çà et là, quelques hypnocystes très mûres et foncées, qui se désagrègent en cellules filles brunes, après une légère compression ; cette désagrégation n'a d'ailleurs jamais été observée qu'à la suite d'une intervention mécanique (voir aussi au paragraphe No 18 les photographies d'hypnocystes et des streptohypnocystes, prises dans une végétation aérienne de la race α sur milieu Coonagar, fig. 41 et 42 pl. IX).

Mycélium interne. Nous donnerons le nom d'internes aux hyphes qui végètent à l'intérieur de la gelée du milieu de culture. Nous retrouvons les hyphes hyalines et les hyphes pigmentées sur toute leur longueur ; ce sont elles principalement qui donnent à la colonie, examinée en lumière transparente, la teinte caractéristique vert-olive. Les hyphes de la périphérie coloniale sont droites et de ramification simple. Nous reviendrons, à propos de la race γ, sur le mode de ramification.

On observe quelques figures d'hypnocystes, mais elles sont peu abondantes et rares dans les jeunes cultures.

Les pycnides ou sacs dans lesquels se sont différenciées les pycnospores, sont distribuées d'une façon sporadique à la surface du milieu. La couleur en est olivâtre-pâle (3me jour), puis rose ; la grandeur est éminemment variable ; elles peuvent atteindre la grosseur d'une tête d'épingle. Chez la race α, les pycnides sont le plus souvent agglomérées en paquets visqueux qui, par rupture de la pellicule glabre et translucide, qui sert de membrane, libèrent un flot gluant de pycnospores. On voit souvent aussi de plus jeunes pycnides développées comme un bourgeon sur une plus ancienne.

Les pycnospores sont des cellules fusiformes non septées, biguttulées et qui sont libérées les unes après les autres par l'orifice de la pycnide, appelé ostiole. Il est intéressant d'observer l'expulsion des pycnospores à raison de plusieurs centaines à la minute. On a pourtant le loisir de voir, par transparence, les spores se placer sous l'influence d'une pression exercée par le corps pycnidial, toutes dans la même position, parallèlement à la direction du canal d'expulsion, et puis être chassées comme les balles d'une mitrailleuse. A peine sorties, les pycnospores s'agglutinent en raison

de leur viscosité et constituent le nuage habituellement observable près des pycnides mûres.

Une étude détaillée a été fournie par H. Schnegg [1] sur la biologie des pycnides ; c'est à lui qu'il faut attribuer l'interprétation des hypnocystes en formes de massues, comme « Dauerzellen » ; on devrait les nommer « resting cells » en anglais, et nous leur avons donné le nom d'hypnocystes muriformes, en français.

Signalons encore, à propos du genre *Phoma*, les études sur la culture dans les milieux nutritifs de Westerdijk et Van Luijk [2]

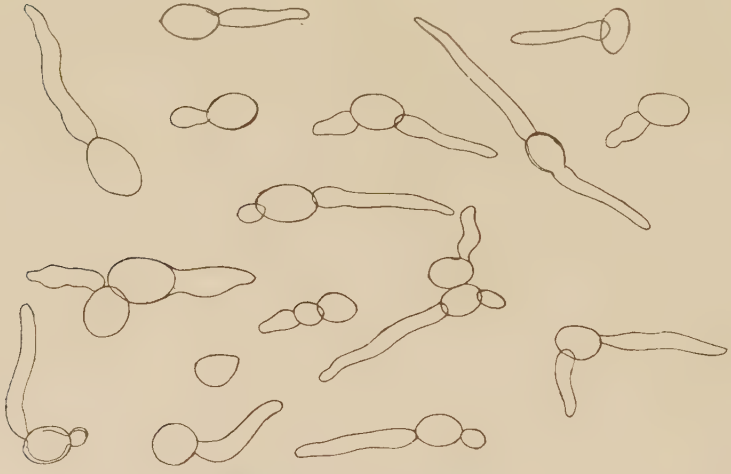


Fig. 12. — Germinations de pycnospores de *P. alt.* α.

Plus directement utile au point de vue génétique, furent les résultats obtenus à la suite d'une recherche statistique de la longueur des pycnospores. Les résultats seront donnés et discutés au paragraphe No 15, simultanément pour les races α, G, γ, V et W.

L'étude de la germination n'a fourni aucune donnée particulière pour une race. Nous donnons une figure dessinée pour la race α à l'âge de 20 heures sur milieu Coon-gélatine à 20° C. (voir fig. 12).

[1] Schnegg, Hans : Zur Entwicklungsgeschichte und Biologie der Pyckniden. Centralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 43. (1915) 326-364.

[2] Westerdijk, J. aud Van Luijk, A : « Die Kultur der Phoma-Arten » Mededeelingen mit het Phytopathologisch. Laboratorium Willie Commelin Scholten, Amsterdam 1920 p. 26.

RACE α : GÉNÉALOGIE ; TRIAGES.

Le 4. IV, on trie 21 pycnospores à partir du tube du 13. III ; l'examen des colonies montre, au cinquième jour, que toutes les boîtes sont identiques et couvertes d'un mycélium aérien cotonneux de couleur gris-mouton ; au dix-septième jour, une boîte dénote le caractère de viscosité au centre, avec affaissement du mycélium aérien. Le 25. IV, les colonies ont couvert les boîtes qui ne montrent aucun secteur ; elles sont mises de côté.

Le 11. IV, le deuxième triage est opéré à partir du tube original du Lister Institut ; 17 pycnospores fourniront 17 cultures du type α ; au quatrième jour, une colonie se montre légèrement différente : 16 montrent une colonie de 22-23 mm. de diamètre, blanche, opaque déjà et couverte de mycélium aérien ; les pycnides ne sont pas encore apparues. La colonie aberrante montre un mycélium interne plus aranéeux, plus lâche ; le mycélium aérien est plus faible. On observe, par dessous, les pycnides serrées, brunes ; au sixième jour, la différence quoiqu'encore visible, laisse certains doutes. Au dix-septième jour, la zone du mycélium marginal aérien, cotonneuse et plus foncée, distingue à peine cette boîte du reste des autres ; à la fin du développement, toutes les boîtes sont couvertes d'une laine grise. Trois tubes de milieu Czapek-agar sont piqués à partir de trois boîtes choisies au hasard, le 28. IV. Un troisième triage est fait le 1er. V, à partir d'un tube Coonagar du 25. IV, issu lui-même d'un tube de pomme-de-terre-agar du 9. II, issu lui-même du tube original de Lister Institut.

23 cellules pycnospores sont placées dans 23 vases Petri, qui fournissent, au bout de six jours, 22 petites colonies appartenant, par la nature des hyphes périphériques, au type α et un au type γ. Au dixième jour, les colonies sont toutes assez semblables ; le mycélium interne, à hyphes pigmentées, donne une bordure brune à la culture. Au dix-septième jour, 22 boîtes par leur mycélium aérien cotonneux, leurs grosses pycnides roses se rattachent au type α ; 1 autre à un type intermédiaire entre α et γ, que nous appellerons dorénavant G. Deux tubes de culture sont inoculés le 18. V. à partir de 2 colonies quelconques α de cette série ; deux autres tubes Czapek-agar sont inoculés à partir de la culture G.

1er triage	21 colonies	pendant 42 jours
2me »	17 colonies	pendant 17 jours
3me triage	23 colonies	pendant 17 jours

61 colonies issues chacune d'une seule spore; il faut ajouter parmi les colonies dérivées 47 autres sur différents milieux ; au total, 108 colonies de la race α.

Sur 108, 106 sont identiques et homogènes ; 1 a présenté un secteur local éphémère ; 1 a manifesté un développement aberrant (G). En somme, il y a une stabilité grande de la race α.

§ 3. RACE γ.

Origine :

Nous avons dit au paragraphe No 2, que le 13. II 1925, une culture pomme de terre-agar sur vase Petri avait été inoculée par la souche α du 9. II. 1925. Cette colonie devenue sectorienne (voir au paragraphe No 17 la description complète), présente au bout d'un mois l'apparence schématiquement représentée à la figure 8.

Le secteur γ est caractérisé par un mycélium aérien élevé cotonneux et par le grand nombre de pycnides foncées et plus petites que celles de la portion restée normale, où elles sont roses. Le 13. III. 1925, un milieu de culture Coonagar en tube est inoculé à partir de cette zone appelée γ ; c'est de cette souche qu'on isole plus tard, le 18. IV, 18 cellules uniques pycnospores. La description suivante se rapporte à ces colonies et à d'autres cultivées ultérieurement.

Morphologie coloniale et anatomie de la race γ sur milieu Coonagar.

Le mycélium aérien est toujours absent. Il faut noter parfois un petit duvet insignifiant ou un mouchet au centre de la colonie.

Mycélium interne.

L'examen, trois jours après l'inoculation, révèle un long mycélium incolore, fourmillant de points visqueux, incolores, transparents ; le mycélium est rare, les hyphes éparses et quasi invisibles.

Au septième jour, la colonie est brune, noirâtre, à cause du grand nombre de pycnides foncées reliées par un réseau de hyphes hyalines ; vus en lumière transparente, les espaces interpycnidiaux sont translucides, alors que chez la race α toute la colonie

est opaque (voir fig. 30 pl. VII). Ce caractère demeure même chez une vieille culture.

Fig. 13. — Hyphes du *P. alt.* γ

Le mycélium est essentiellement composé de hyphes à articles courts et hyalins (voir fig. 13) ; les hyphes à cellules allongées sont rares et la pigmentation fait défaut partout à l'exception des pycnides et hypnocystes (voir fig. 14). Par contre, les globules graisseux sont fréquents dans toutes les cellules. Les hypnocystes n'apparaissent que tout à fait exceptionnellement dans ce milieu (voir fig. 15). La ramification des hyphes périphériques est tourmentée ; c'est, là même, le premier signe qui puisse distinguer une jeune végétation de la race γ d'une végétation de la race α ; la fig. 16 montre les deux types de mycélium marginal. Il faut, à ce pro-

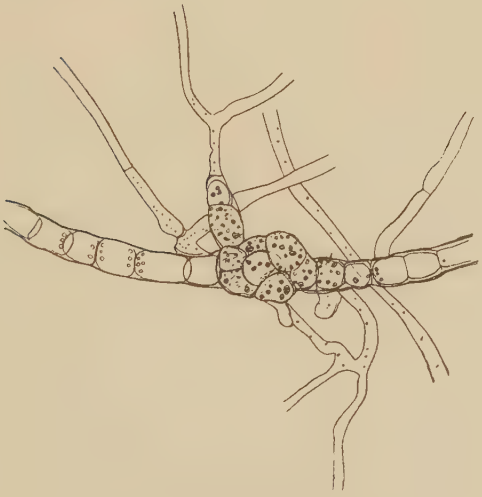


Fig. 14. — Hyphes du *P. alt.* γ

pos, consulter au paragraphe No 5, les indications données pour les races V et W et les figures 17 et 18.

Les pycnides sont plus petites que celles de α (voir la photographie de la figure 31 pl. VII au paragraphe No 13) ; elles sont

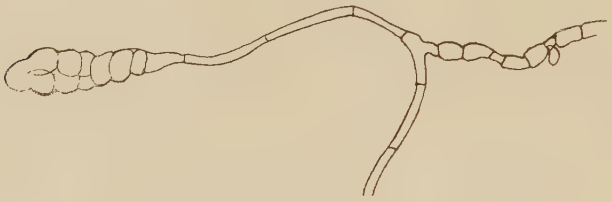


Fig. 15. — Hypnocystes du *P. alt.* γ

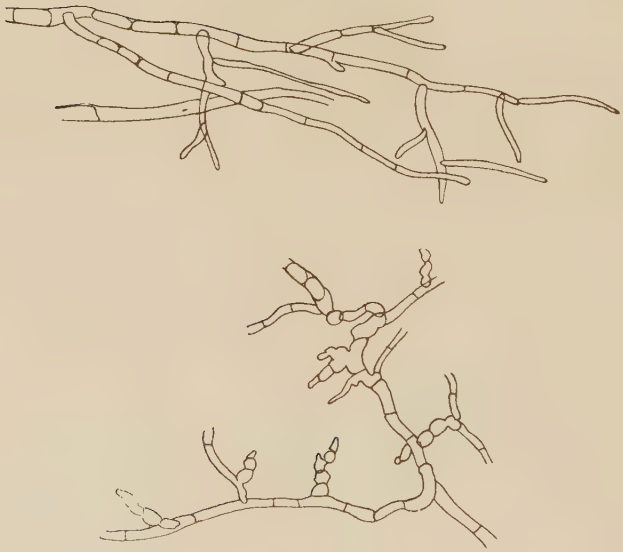


Fig. 16. — Ramification des hyphes périphériques, en haut type α simple, en bas, type γ, tourmenté.

aussi plus régulièrement et densément distribuées à la surface de la colonie (voir fig. 30 pl. VII.)

Les pycnides de la race γ sont des corps de fructification, émergeant, pour la presque totalité de leur volume, du milieu de culture,

c'est-à-dire qu'elles sont amarrées dans un réseau de hyphes qui les relient les unes aux autres ; il en est autrement des pycnides de la race α qui sont au trois-quart immergées dans la gelée et apparaissent comme une légère pustule rose. A la situation plus aérienne des pycnides de la race γ, correspond aussi une modification de structure : l'ostiole est moins visible ; l'enveloppe de la pycnide est plus ferme et constituée de cellules fortement pigmentées. Les pycnospores ne sont pas pigmentées et ressemblent fort à celles de la race α ; le mode de leur longueur est de 4,75 (voir paragraphe No 15), soit le même que celui de la race α.

Race γ : Triages.

Le 18. IV, on isole 18 cellules spores du tube de culture γ du 13. III ; les jeunes colonies sont piquées le 20. IV sur 18 milieux de culture Coonagar ; au quatrième jour (24. IV), les colonies sont glabres et constituées par un mycélium interne où les pycnides sont disposées en chapelets sur les hyphes ; ces dernières ont le mode de ramification caractéristique pour γ. Au treizième jour (1. V), la série de colonies présente une variabilité considérable dans la couleur coloniale. Une potentialité variable se montre donc chez les pycnospores de la race γ, en ce qui concerne la production de pigments intracellulaires dans les tissus qui en dériveront. On ordonne les cultures de la plus claire, dite boîte blanche, jusqu'à la boîte la plus foncée, dite boîte noire ; tous les termes de passage s'intercalent, et la boîte du milieu de l'échelle prend le nom de moyenne. Le 2. V, on inocule trois boîtes Coonagar à partir des deux termes extrêmes et de la moyenne, dans le but de voir si les qualités de coloration coloniale se maintiennent. Au quatrième, cinquième jour déjà, et pendant les jours suivants, ces colonies ont développé des végétations d'un type de couleur moyenne. Le 14. V. et le 15. V., on trie des spores de la culture dite noire et de la culture dite blanche.

Au bout de quatorze jours, soit le 27. V. on compare les 11 colonies issues de la culture blanche et les 13 colonies issues de la culture foncée ; cette dernière série est faiblement plus foncée en moyenne que la série dérivant de la culture blanche ; ces 11 colonies montrent une faible variabilité et les plus pâles, une tendance à fournir des secteurs marginaux. En résumé, les différences de

coloration coloniale, montrées par le premier triage de γ, appartiennent à l'ordre de la fluctuation propre à chaque génération. De ces séries, trois colonies servent à l'inoculation de trois tubes de culture, dont l'un sert de souche pour inoculer la série du 6. VI. soit : 9 boîtes de Coonagar où le sucre varie de 0 % à 100 % et 9 boîtes où l'asparagine varie de 0 % à 100 %, des quantités prévues par le milieu de Coon. Ces 18 boîtes, pendant quinze jours d'observation, ne montrent aucun secteur, ni plus tard.

Résumé : 63 colonies de la race γ ont été suivies, dont 42 à partir de spores uniques ; pas une, au cours de quatre générations, n'a donné le moindre secteur.

§ 4. RACE G.

Origine :

Parmi les 23 colonies issues du troisième triage des pycnospores de α (1. V. 1925), une se trouve être différente des autres au bout du septième jour de croissance déjà. Le premier indice qui permet de distinguer cette colonie des autres du type α, est la nature de la ramification des hyphes périphériques ; cette ramification est du type γ, c'est-à-dire tourmentée. Au dixième jour, la boîte appelée G se distingue à peine des autres. Au dix-huitième jour, la boîte G se caractérise au milieu de 22 colonies identiques du type α, par le grand nombre de pycnides, toutes en chapelet jusqu'au bord de la colonie ; un léger mycélium aérien recouvre la boîte et la rapproche, par là, du type α ; les pycnides de G ne sont pas aussi foncées que celles de la race γ.

Morphologie coloniale et anatomie de la race G sur milieu Coonagar

Le mycélium aérien fait rarement défaut. Au troisième jour, on observe un mycélium aérien partiel ; au sixième jour, un centre cotonneux du type α ; le septième jour, l'amas cotonneux abondant de couleur blanchâtre s'étale sur la colonie. Au cinquante-quatrième, on observe un mycélium aérien blanc, constitué par des hyphes hyalines multiramifiées. Ce gazon, chez une colonie âgée, est souvent une végétation secondaire, car il arrive que le mycélium aérien de G disparaisse de bonne heure par le fait que le milieu agar est hydrolysé à la surface. La croissance du mycélium

interne superficiel liquéfie l'agar ; le liquide reste emprisonné sous forme de gouttelettes suintantes au travers de la pellicule de surface, qui prend en raison de celà, une apparence pustulée visqueuse. Ce procès débute au centre de la colonie, et gagne finalement toute la culture. Au fur et à mesure que cette hydrolyse s'accomplit, le mycélium aérien s'affaisse et disparaît. Ce phénomène s'observe parfois, mais rarement chez la race α, jamais chez la race γ. Il faut signaler l'absence des figures d'hypnocystes muriformes dans le mycélium aérien même âgé ; on y voit cependant quelques figures d'hypnocystes hyalines en chaînettes et d'autres formes chez lesquelles les articles sont disposés en pseudoconidies hyalines (voir fig. 43 pl. IX, au paragraphe No 18, qui donne une idée de cette végétation chez la race γ).

Le mycélium interne est constitué de hyphes à cellules pigmentées et de hyphes à cellules hyalines. On n'y trouve aucune figure d'hypnocystes muriformes ; c'est même un caractère constant de G que le manque d'éléments hypnocystes. Les chaînes oïdium à cellules hyalines sont réduites ou n'apparaissent que sous la forme d'un simple renflement bulbaire.

Quant aux pycnides, elles sont intermédiaires, en ce qui concerne la couleur et la grandeur, entre celles de la race α et celles de la race γ. Leur distribution en chapelet suivant des lignes tourbillonnantes, est un caractère particulier de la race G. Les pycnides sont brunes, foncées, non agglomérées et se rapprochent de celles de la race γ.

Les pycnospores ont une longueur variable ; l'étude statistique révèle deux modes principaux, l'un sur la valeur μ 4, l'autre sur la valeur μ 4,75 (voir paragraphe No 15).

Race G : Triages, généalogie.

La race G fut obtenue à partir d'une spore unique comme type aberrant au milieu de 22 colonies du type α, toutes issues de spores uniques. Cette culture G, du 1. V, sert à l'inoculation, le 18. V, d'un tube Czapek-agar, qui deviendra le point de départ d'un triage de 27 pycnospores G ; 21 colonies dérivent de ces spores ; 17 de ces cultures sont doublées par une culture en bouteille plate ; au total, on a 38 colonies, observées pendant deux mois; 20 montrèrent

une croissance homogène, 13 des plages plus ou moins marquées et 5 des secteurs nets.

La culture sur Czapek-agar du 18. V, est repiquée le 22. V. sur Czapek-agar de nouveau ; le 6. VI, 18 boîtes sont inoculées sur un milieu Coon-agar où le sucre et l'azote varient. Parmi ces 18 boîtes, deux fournissent des secteurs bien nets; l'une, en particulier, donnera les races V et W. En résumé, sur ces 57 colonies de la race G, nous avons eu 7 boîtes qui montrent des secteurs et la plupart des autres ont une colonie plus ou moins hétérogène qui manifeste la tendance à produire des secteurs. La race G se révèle donc comme très instable. Ce caractère a été observé plus tard encore sur d'autres milieux.

§ 5. RACES V ET W.

Origine :

La race G a été inoculée sur une série de milieux Coonagar, différant les uns des autres par la teneur en azote (asparagine), de 100% de la quantité totale prévue par le milieu, à 0% de ladite quantité. Partout, la croissance de G se fait d'une façon homogène, exception faite de la boîte dépourvue d'azote aminé ; le champignon s'y développe, au début, sous forme d'un mycélium incolore à hyphes hyalines ; il n'y a pas de gazon et la surface de la colonie a l'apparence d'un empois d'amidon ; puis, soudainement, à des distances différentes du centre de la colonie, se différencient des hyphes pigmentées, d'où résulte pour la colonie une apparence d'étoile blanche au milieu d'un fond sombre. Le début de croissance incolore ne correspond pas à celui de la race G ; toutes les inoculations de G ne fournissent pas ce même développement ; aussi, convient-on d'appeler « V » la végétation hyaline en étoile ; on appellera « W » le secteur marginal pigmenté. De chacune des zones V et W, on inocule un nouveau milieu de culture Coonagar, le 25. VI. 1925, soit dix-neuf jours après l'inoculation de G qui fournit les deux races en question. Les tubes V et W sur Coonagar du 25. VI, servent à l'inoculation de deux milieux Coonagar en vase Petri, le 2. IV. 1925. A partir de ces deux boîtes, on inoculera le 10. IX. 1925, deux tubes de milieu Coonagar; ces tubes seront eux-mêmes le point de départ (le 28. IX. 1925) de deux colonies

sur milieu Coonagar où l'asparagine est remplacée par du tartrate d'ammonium. Ces tubes de V et W, sur Coonagar, à base de tartrate d'ammonium, fourniront (le 16. XI. 1925), le premier, 12 colonies issues de 12 pycnospores de V, le second, 8 colonies issues de 8 pycnospores de W. C'est, en se basant sur ces cultures sélectionnées, que les descriptions suivantes sont faites.

Lors de la production par V d'une zone marginale fertile et pigmentée « W » on eût pu dire que la forme anormale stérile et hyaline de G, race V, retournait au type G normal ; bien que W se rapproche beaucoup de G, il n'y a pas pourtant similitude des deux races, de telle façon que nous avons cru bon de conserver le terme W pour qualifier une forme nouvelle née par mutation sectorienne de V.

D'ailleurs, la tendance à produire des secteurs de mycélium incolore et stérile, qui à leur tour redonnent une végétation fertile, s'est manifestée plusieurs fois au cours des cultures de la race G ; l'instabilité est même devenue caractéristique de cette race. Ainsi apparurent les races homologues N à W et B à V, par des secteurs identiquement disposés et provenant également de G. (v. paragraphe No. 6).

Morphologie coloniale et anatomie des races V et W sur milieu Coonagar

V montre au cinquième jour une colonie blanche incolore et glabre ; W a une colonie pigmentée et couverte d'un mycélium aérien avec un mouchet central. V a une végétation stérile, et, si par hasard on trouve une pycnide, elle ne libère pas de pycnospores.

Il faut ici remarquer que la description donnée rappelle un état de la race V, tel qu'on pouvait l'observer au début de son existence ; après quelques passages sur le même milieu Coonagar et le temps écoulé du 6 juin au 16 novembre 1925, soit plus de cinq mois, la stérilité de V a progressivement diminué ; il y a là un cas intéressant de mutation lente qui permet la récupération d'un caractère perdu, en apparence complètement, au cours d'une mutation brusque. Le cas est d'autant plus intéressant qu'on ne peut guère l'homologuer à ces cas connus de récupération de virulence ou de toxicité chez les bactéries, par passage sur un hôte. En effet, il y a là comme facteur essentiel et non analysé, l'influence modifi-

catrice de l'hôte sur son parasite ; tandis que dans la fertilité renaissante de la race V, on ne voit guère l'influence exercée par un milieu, toujours le même et inerte sur l'organisme qui s'y développe. Quel que soit le mode par lequel V revient à la forme fertile, petites mutations ou auto-sélection de lignées fertiles, cette fertilité ne redevient pas très grande et n'atteindra jamais celle de la race W ; elle suffit néanmoins pour procéder au triage des pycnospores. W, par contre, au cinquième jour a développé des pycnides qui libèrent facilement des pycnospores. Dès le huitième jour, l'examen microscopique révèle que V a des hyphes périphériques du type γ et W du type α, ainsi que le montrent les figures 17 et 18. Ces caractères anatomiques se sont toujours retrouvés ; ils ne sont cependant bien visibles qu'au début de la végétation ; les photographies de la figure 19 pl. III. se rapportent à des colonies âgées de trois jours ; à treize jours d'âge, ces différences dans le mycélium de bordure sont bien atténuées ; la prédominance dans le mycélium de W de hyphes qui forment des anses et, dans celui de V, de hyphes à courtes ramifications, demeure cependant. Aucune de ces figures n'est exclusivement montrée par l'une des races ; il s'agit toujours de dominance d'un type de ramification. Le mycélium aérien de W est court, répandu partout et de couleur gris-blanc ; on note fréquemment la présence de hyphes en tourbillons dans le mycélium interne de W ; la colonie a une couleur brun olive. Les pycnides y sont brunes, petites et réunies comme en un chapelet.

La vitesse de croissance sur le milieu Coonagar est sensiblement la même pour les deux races. Mesures du diamètre des colonies pour :

		V	W
le cinquième jour	mm.	14,5	18
le sixième jour	»	20,5	24
le huitième jour	»	28,5	31
le douzième jour	»	40	45
le treizième jour	»	50	50

La race W est un peu plus rapide dans la croissance en diamètre.

Races V et W : Triages, Généalogie

La colonie sectorienne de G du 6. VI, sert de souche pour inoculer un tube de Coonagar le 25 VI, à partir du secteur V et un

Fig. 17. — Hyphes du *P. alt.* W ; ramification simple, éléments pigmentés.

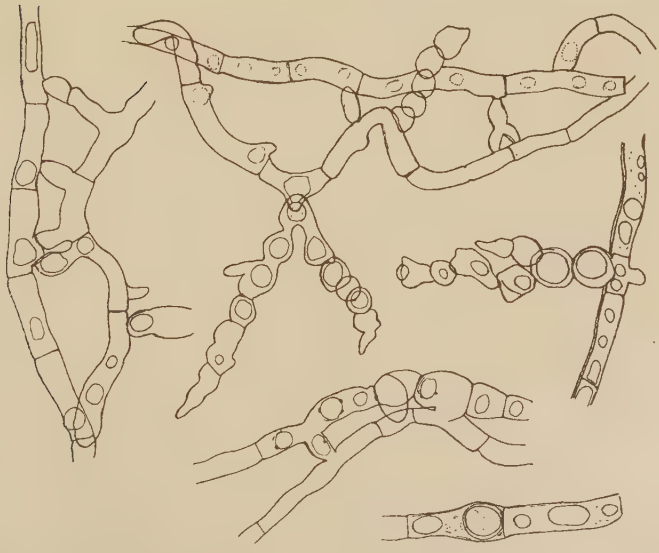


Fig. 10. — Hyphes du *P. alt.* V. ramification tourmentée éléments hyalins.

second à partir du secteur W. De ces deux tubes on inoculera, le 2. IX, 4 boîtes Coonagar : 2 pour V et 2 pour W. Un premier triage est opéré à partir de ces boîtes le 10. IX ; une spore de V sert à inoculer un tube Coonagar, une spore de W un autre tube du même milieu. Deux paires de tubes, l'un Coonagar à base de nitrate d'ammonium, l'autre à base de tartrate d'ammonium, sont inoculées le 28. IX, respectivement par les cultures monosporées de V et de W. Des cultures V et W sur milieu Coonagar-tartrate d'ammonium on inocule le 8. X, cinq boîtes Coonagar avec différents sucres. Les mêmes cultures du 28. IX, servent de souche pour le triage de 12 pycnospores V et de huit pycnospores W (16. XI et 11. XI). Du triage de V dérivent plus de 30 colonies sur différents milieux ; du triage de W dérivent plus de 20 colonies sur différents milieux. En résumé, pour V, 48 colonies ont été suivies ; pour W, 44 colonies ont été suivies. La race W a fréquemment fourni des secteurs de mycélium stérile, en particulier sur les milieux pauvres en azote ; la race V a donné quelques secteurs pigmentés et fertiles, reconstituant ainsi la race W, en particulier sur le milieu moût-agar pauvre en azote.

W et V ont manifesté une instabilité nette.

§ 6. SOUCHES B ET N

Origine.

Nous avons dit, dans le paragraphe concernant l'origine de V et W, que le type de mutation qui avait produit ces deux souches, s'était répété plusieurs fois au cours des cultures de G. C'est ainsi que furent obtenues les races B qui est l'égale de V et N l'égale de W; une culture Coonagar complet ayant été inoculée par G, donna lieu à un développement central incolore (B) suivi d'une zone marginale pigmentée (N). Ces deux races n'ayant jamais été sélectionnées ultérieurement à partir de spores uniques, nous n'attacherons pas la même valeur aux observations qui vont suivre, qu'à celles faites à propos de V et W.

Nous signalerons ici immédiatement les différences qui ont été observées entre ces deux races sur le milieu type et d'autres milieux.

Milieu Coonagar : la race B, à sept jours d'âge, est incolore, blanche et stérile ; la race N est brune et fertile. Si on substitue au maltose

du saccharose on a la même différence. La substitution de lactose au maltose laisse la race B blanche comme sur saccharose ; quant à N, il fournit sur ce sucre une colonie fertile, brune avec un secteur du type B, blanc. En mettant du galactose à la place de maltose, B donne sur ce milieu une colonie avec un faible secteur. N donne une colonie brune, fertile avec des secteurs du type B. On peut résumer, en disant que le galactose et le lactose favorisent la production de secteurs plus que le maltose et le saccharose.

Sur milieu Coonagar où l'asparagine a été remplacée par du tartrate d'ammonium, B fournit un mycélium aérien ; la colonie est incolore ou à peine teintée, tandis que N a un mycélium aérien pauvre, en une tache blanche ; un abondant réseau pycnidial du type G fournit une couleur rose saumoné à la colonie de N. Sur milieu Coonagar (où l'asparagine a été remplacée par du nitrate d'ammonium), B donne une abondante colonie d'apparence grasse et riche en pycnides incolores ; N a un aspect moins gras ; les pycnides y sont brunes. Pour ce qui est de ces deux milieux riches en azote, on peut dire en résumé que la race B récupère plus aisément sa fertilité quand l'azote assimilable se trouve sous forme de nitrate d'ammonium que lorsqu'il est offert sous forme de tartrate d'ammonium.

En faisant croître les races B et N sur des milieux Coonagar où la quantité totale d'azote du milieu varie de 100 % à 0 %, on observe :

1. Que B qui est blanc sur un milieu Coonagar complet, devient graduellement noir sur un milieu dont la teneur en azote décroît. L'examen microscopique de boîtes âgées de un mois huit jours, révèle pour B sur milieu 100 % d'azote des hyphes absolument hyalines, tandis qu'elles sont nettement foncées sur un milieu à 3 % de l'azote total.

2. Pour N, sur le milieu normal (100% d'asparagine), une colonie d'apparence humide où dominent les hyphes à cellules pigmentées qui se suivent en longs filaments bruns. Au fur et à mesure que l'azote disparaît, la hauteur du mycélium diminue et les articles des hyphes sont alternativement pigmentés et hyalins.

Une deuxième série de cultures de la race B sur Coonagar où l'azote varie, montre une irrégularité telle de la croissance en surface, qu'il est impossible de mesurer l'augmentation en diamètre

de la colonie ; le mycélium, au lieu de se développer d'une manière concentrique, est « affolé ».

On verra au paragraphe No 19, la description des secteurs produits au cours de ces cultures.

N. B. L'origine de la race b issue par mutation de secteur de γ, sera décrite au paragraphe No 20.

§ 7. COMPARAISON DES MORPHOSES INDUITES CHEZ LES DIFFÉRENTES RACES

Nous avons, dans les paragraphes qui précèdent, décrit les végétations de cinq races et deux souches, telles qu'elles se présentent sur un milieu conventionnellement choisi comme milieu-type ; parmi les milieux de cultures essayés, le milieu de Coon solidifié par de l'agar-agar s'était montré favorable pour déceler les différences existantes entre ces races ; aussi, l'avons-nous choisi. Mais il va de soi que les descriptions de ces cinq races, suffisantes pour les reconnaître sur ce milieu donné, méritent d'être complétées par les descriptions des mêmes lignées sur d'autres milieux. Il en est pour nos petites espèces de champignons, un peu de même que pour les bactéries : leur comportement sur un seul milieu ne suffit pas à les caractériser.

Nous avons donc entraîné simultanément nos cinq races dans les conditions de vie les plus diverses, pour déterminer leur caractères spécifiques de résistance et d'accomodation, caractères qui souvent ne peuvent être soupçonnés sous l'uniformité morphologique et dans la monotonie des conditions offertes par un unique milieu.

Les variations de conditions de vie induisent des morphoses, qui, pour générales et communes qu'elles soient aux différentes races, dans leur sens, n'en demeurent pas moins, dans leurs qualités et intensités, particulières et spéciales à chacune des races.

Les caractères de morphose ne sont pas à rejeter dans une étude de génétique ; la mention de leur présence ou de leur absence et la mesure de leurs intensités relatives fournissent aux diagnoses de races un complément indispensable. Ces caractères ont d'ailleurs l'avantage de se laisser exprimer d'une façon quantitative ; ces mesures confèrent donc aux descriptions de race une valeur objective bien appréciable pour la critique.

Trop rares sont, en effet, les caractères morphologiques dont on puisse, chez les Phoma, fournir la mesure ; quant aux descriptions de colonies ou impressions d'ensemble, elles restent quoique fidèles, difficilement estimables.

Nous avons donc étudié comparativement pour cinq races l'influence qu'exercent sur la végétation de ces champignons, les hydrates de carbone d'une part et l'azote de l'autre. Les mêmes morphoses étaient *simultanément* réalisées pour les différentes races, chacune de celles-ci étant représentée par deux cultures en vase Petri, souvent trois, rarement une.

Je signale ici les observations de W. Brown, qui dans ses études sur le genre *Fusarium*, a analysé les facteurs qui déterminent les types de croissance de certaines races. Cet auteur, soucieux d'établir les causes de la variabilité extraordinaire de ce genre, les a surtout recherchées dans les conditions du milieu. En faisant varier ces dernières, l'auteur induit une série de morphoses qui permettent d'évaluer le rôle respectif de chacun des constituants du milieu.

La critique des phénomènes d'auto-intoxication ou d'auto-inhibition de croissance, appelée « staling effect » en anglais, est très bien présentée dans cet article.

Dans une publication ultérieure, W. Brown signale des « saltations » qui arrivent plus fréquemment sur certains milieux que sur d'autres.

§ 8. HYDRATES DE CARBONE

Les premières expériences consistèrent à faire varier la concentration en sucre (maltose) de 100 % à 0 % de la quantité totale prévue par le milieu de Coon, toutes les autres conditions restant par ailleurs égales. Les différents milieux préparés contenaient respectivement 100% (Coon complet), 75 %, 62,5 %, 50 %, 37,5 %, 25 %, 12,5 % et 0 % de la quantité de maltose exigée par la formule de Coon.

Concentration	
Relative	Absolue
100 %	3,6 ‰
75 %	2,7 ‰
62,5%	2,25 ‰
50 %	1,8 ‰
37,5%	1,35 ‰
25 %	0,90 ‰
12,5%	0,45 ‰

[1] Brown, W. : Studies in the genus Fusarium
II. Annals of. Bot. Vol. XXXIX (1925) 373-408
III. ibid. Vol. XL (1926) 203-221
IV. ibid. Vol. XL (1926) 223-252

Effets sur la croissance du diamètre des colonies.

Les races α, G et γ se comportent de même, c'est-à-dire diminuent la vitesse d'extension de leurs colonies dans la mesure où la quantité de sucre disponible diminue.

La diminution de croissance en diamètre des colonies sur milieu de Coon solidifié par de l'agar, en fonction des quantités de maltose, se marque sur le graphique (voir fig. 20). Sur l'abscisse, sont portées les valeurs proportionnelles aux concentrations sucrées ; chaque ordonnée représente donc un milieu de culture particulier ; les mesures du diamètre des différentes colonies à un âge donné, sont inscrites chacune sur l'ordonnée correspondant au titre sucré de son milieu ; la même opération est refaite à un âge plus avancé et ainsi de suite ; il faut tenir compte que tous les chiffres de diamètre inscrits sont les moyennes de trois mesures de colonies sur milieux identiques. On voit sur chacun des graphiques, établis pour les trois races α, G et γ, les obliques s'élever de gauche à droite et montrer nettement par là que la colonie grandit en surface proportionnellement aux quantités de sucre présentes. Il n'y a pas de différence notable entre les trois races. Un optimum de concentration paraît correspondre à la teneur 75%, soit valeur absolue 2,7 ‰. Quelques chiffres obtenus au cours du développement de la race W, nous indiquent que l'absence de sucre retarde la croissance au début sans que cet effet se poursuive plus tard.

Effets sur le mycélium aérien (gazon).

La diminution du sucre entraîne la réduction du mycélium aérien chez les races α, G, γ, V et W ; cette disparition peut être totale quand le sucre fait complètement défaut. Au centre de chaque culture, se constitue généralement un mouchet de mycélium aérien ; il varie d'ailleurs avec chaque race, tantôt en dôme, tantôt en plumet, etc ; la carence de sucre les fait tous disparaître et, après eux, les derniers vestiges de gazon. C'est à partir de 50% de la teneur totale en sucre jusqu'à 12,5 % que la diminution du mycélium se marque ; on peut dire qu'à 12,5% de sucre, les colonies sont glabres. Il n'y a pas lieu de signaler à ce propos de différences notables entre les races étudiées.

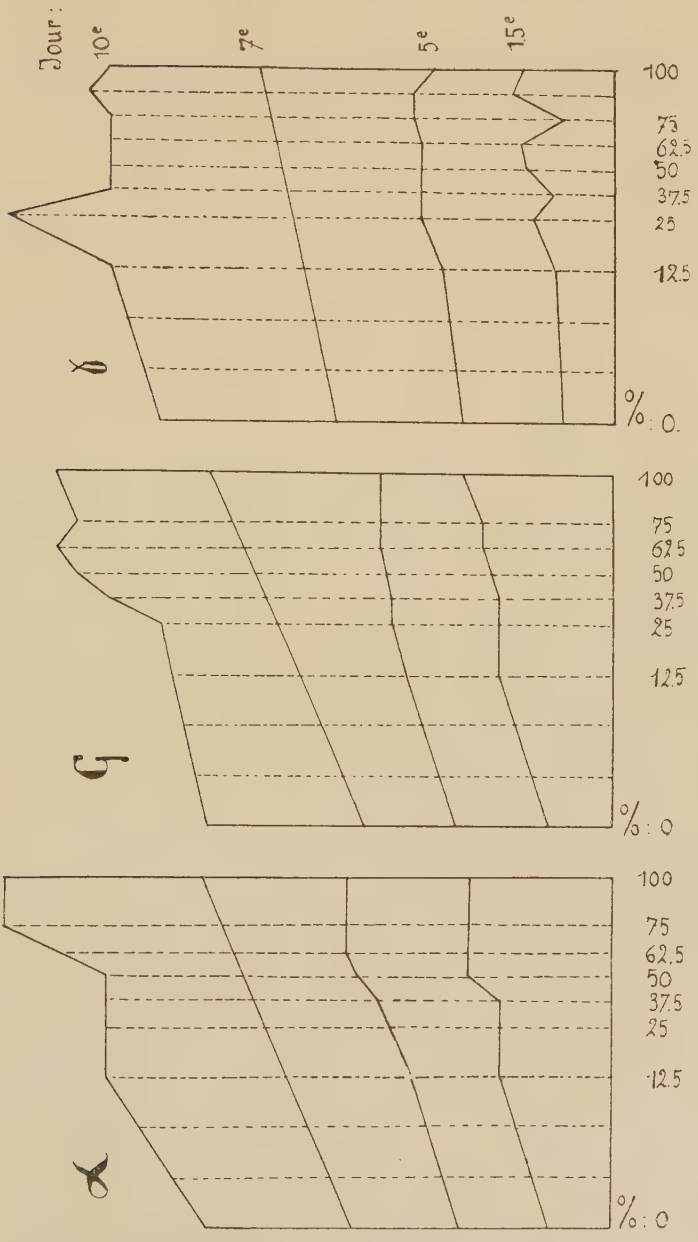


Fig. 20. — Comparaison des croissances en diamètre des races α, G, γ, sur des milieux Coonagar où la teneur normale en maltose varie suivant le % indiqué.

Effet sur la couleur des colonies.

La disparition du sucre détermine un pâlissement très net des disques de culture. On peut passer du blanc de neige au noir charbon.

Cette propriété est commune aux races α, G, γ, W.

La race V qui est, en temps normal, blanche incolore même sur 100% de maltose, échappe à cette règle. La décoloration apparaît le plus vite chez G, puis α, puis W, puis γ.

Ce n'est que l'examen morphologique et histologique qui nous donnera l'explication de ce fait.

Effets sur la morphologie.

La diminution du sucre transforme complètement le régime anatomique. Nous avons vu précédemment que le mycélium interne est constitué de hyphes à articles hyalins et de hyphes à articles foncés, brun-olive. La diminution et surtout l'absence totale de sucre entraîne la disparition complète de la pigmentation cellulaire ; les articles deviennent absolument transparents, à tel point qu'étant donné l'absence de tout mycélium aérien, il est malaisé de distinguer l'invisible réseau mycélien de la colonie. Cette dernière est pourtant parfaitement développée et ponctuée comme à l'ordinaire de toutes ses pycnides ; la disparition de la nourriture hydrocarbonée n'affecte ni la concentration, ni la grandeur des pycnides, devenues de petites boules incolores qui ne se détachent plus sur le fond de la colonie. Cette dépigmentation se répercute jusque sur les pycnospores qui abandonnent leur teinte glauque.

Les globules graisseux diminuent considérablement dans les cellules. Au point de vue anatomique, la première remarque à faire est la réduction, puis la disparition absolue des éléments hypnocystes, toujours plus colorés que le reste de la hyphe, de laquelle ils se détachaient ; plus trace de cellules durables, en forme de massues ou de grappes ; le mycélium a une tendance à se simplifier en un mycélium à grandes cellules allongées hyalines ; les cloisons sont plus distantes. Il faut toujours se rappeler que le substratum agar, si peu hydrolysable qu'il soit, peut cependant fournir quelque aliment hydrocarboné à ces champignons, parasites habituels de milieux à polysaccharides.

La carence de sucre réduit considérablement les différences existantes entre les races ; sur un milieu totalement dépourvu de sucre, il est bien difficile de reconnaître les races les unes des autres, à moins qu'un excès de nourriture azotée n'exagère les caractères raciaux des pycnides. Ainsi, sur le milieu Coonagar, sans sucre, les colonies de α, G, γ, W, N, âgées de 15 jours, sont semblables; seules celles de V et B se distinguent nettement par leur stérilité partielle. On peut conclure que la nourriture hydrocarbonée est une source de différenciation.

§ 9. - CULTURES SUR DIFFÉRENTS SUCRES.

Le milieu Coonagar contient du maltose : il était intéressant d'observer comment se comporteraient nos races pures en variant cette fois-ci, non plus la quantité, mais la nature même des sucres dans le milieu de Coon.

On a substitué au maltose d'autres disaccharides : saccharose, lactose ; puis des hexoses : glucose, lévulose, mannose, galactose ; enfin, des pentoses : arabinose, xylose. La première remarque fut que certaines des races qui jusqu'à présent avaient toujours montré une grande homogénéité dans leurs colonies, manifestèrent des secteurs.

Première série : Cultures âgées de 12 jours sur Coonagar :

	Races :	*Maltose*	*Saccharose*	*Lactose*	*Galactose*
H = colonie	α	H	H	H	H
homogène	G	H	H	H	H
S = colonie	γ	H	S	H	H
sectorienne	N	H	H	S	S
	B	H	H	H	S
	W	H	H	H	H
	V	H	H	H	H

La race γ montre un secteur bien net (voir plus loin : chapitre colonies sectoriennes), qui est représenté à la figure 48 pl. X. Les secteurs montrés par les races N et B n'ont pas la même significa-

tion génétique, puisque seules ces deux races ne furent pas sélectionnées à partir d'une cellule unique.

De cette première série de cultures, se dégagent les faits suivants :

La race α a développé un mycélium d'apparence et de composition très semblable, sur saccharose, à ce qu'elle montre sur maltose ; la colonie est peu colorée, sauf aux endroits de concentration de pycnides ; tandis que sur lactose et galactose, elle donne lieu à des disques coloniaux beaucoup plus pigmentés ; il semble donc que ces deux derniers sucres favorisent la production de réserves chromogènes. L'examen anatomique de cultures âgées de 48 jours, révèle dans le mycélium aérien de α sur Coonagar-maltose des figures d'hypnocystes hyalines en chaînette ; il en est de même sur Coonagar au saccharose. Tandis que la même souche α a différencié dans le mycélium aérien développé sur Coonagar-lactose, un beaucoup plus grand nombre de ces figures et d'hypnocystes muriformes nettement pigmentées ; le lactose est de beaucoup le sucre le plus favorable à la production de ces figures ; le galactose l'est aussi, mais à un moindre degré.

La race G se comporte d'une manière analogue en distinguant, d'une part maltose et saccharose, peu favorables à la pigmentation et de l'autre, lactose et galactose plus favorables. La race G, par ce caractère, se rapproche plus de α que de la race γ qui développe des colonies constituées de mycélium également hyalin sur les quatre sucres ; il faut pourtant signaler le secteur très foncé de γ sur saccharose (voir figure 48 pl. X.) qui dénote la différenciation d'un rameau mycélien plus adapté à se servir du saccharose.

Une deuxième série de cultures sur les sucres suivants : lévulose, mannose, galactose, arabinose, xylose, montre que sur ces différents sucres, les races α, G et γ conservent les caractères différentiels suivants : α possède un mycélium aérien et des pycnides de couleur rose fort irrégulièrement réparties à la surface de la colonie.

G se rapproche nettement de α par ces caractères ; γ a une colonie glabre, fournie de pycnides, plus petites et fermes.

Comme particularités, on observe sur des cultures âgées de 15 jours :

1. Que α, sur Coonagar-arabinose, produit dans son mycélium interne un grand nombre d'hypnocystes noires ; on ne les retrouve pas sur Coonagar-xylose, mannose, galactose, lévulose.

Croissance en diamètre des races α et γ sur Coonagar avec différents sucres ;
(Valeurs absolues en mm.)

Jours	Arabinose		Xylose		Mannose		Galactose		Lévulose		Glucose	
	α	γ	α	γ	α	γ	α	γ	α	γ	α	γ
4e	8.5	9.5	7.75	7	7.75	6.5	9	6	9	8.25	7.5	7.5
7e	19.5	17.75	17	15.25	17.5	15	16.25	12.5	17.75	18	17.5	15.5
9e	35.5	24.75	23.5	22	24.5	22	24	18.5	25	25.25	24.5	22.75
12e	32.75	28.75	28	26.75	30.25	25.25	28	22.5	29.75	29.75	29.5	26.75
11e	37	32	32.5	30	35	30	33	26.5	35	33	34.5	30.75
18e	45	37.25	38	34.25	40.25	34.75	39	30.75	41.5	39.5	42.5	35.25
23e	53.75	47.75	44	43	48.5	41.5	46.5	36.5	51.5	47	51.5	43.75
26e	58.5	55	52	47	60	47	52	41	59.5	53.5	59.5	49
30e	60	60	54	50.25	63.5	50	54.5	—	65	55.5	64	53
37e	—	67.5	—	—	- -	56.75	—	—	—	61	—	59.5

2. Que G ne produit sur aucun sucre des hypnocystes.

3. Que γ produit sur Coonagar-mannose beaucoup d'hypnocystes, alors qu'il ne le fait pas sur les autres sucres.

D'une manière générale, arabinose et mannose favorisent mieux la production de réserves chromogènes intracellulaires, que ne le font le galactose et le xylose

§ 10. RACES V ET W SUR DIFFÉRENTS SUCRES.

Coonagar sans sucre :

Une colonie de W montre au quatrième jour un mycélium aérien faible, sans pycnides visibles ; le neuvième jour, un mycélium hyalin, presqu'invisible couvre la boîte ; les pycnides sont abondantes, hyalines et disposées en chapelets jusqu'au bord de la boîte; le seizième jour, le caractère d'invisibilité a persisté.

V montre au cinquième jour, un mycélium quasi-invisible à pycnides hyalines ; la même apparence persiste au seizième jour, sauf en ce qui concerne l'apparition de pycnides ; la colonie a une apparences régulière, circulaire, que ne montre pas celle de W. Au bout d'un mois, la colonie est demeurée hyaline avec des pycnides apparaissant comme des points graisseux.

Arabinose :

Au bout de cinq jours, la colonie de W montre un mycélium aérien et des pycnides roses ; au neuvième jour, la colonie est déjà foncée et le mycélium aérien prend, au seizième jour une teinte beige-olive ; on note un secteur marginal du type V ; au bout d'un mois, la colonie est devenue très foncée, couverte de mycélium aérien et très fertile en pycnides.

V débute par un mycélium aérien blanc ; au bout d'un mois, la pigmentation est très pâle, beige, et la colonie se montre peu fertile.

Xylose :

La colonie de W montre au quatrième jour un fort mycélium aérien ; d'autre part, les pycnides ne sont pas aussi visibles que sur le milieu arabinose ; dès le neuvième jour, la colonie fonce.

Il y a deux petites langues sectoriennes au bord de la colonie. Au bout d'un mois, la colonie est très fertile et foncée.

V débute par un mycélium aérien blanc, puis gris; il y a quelques plages de pycnides noires ; le dessous de la culture est irrégulier ; au bout d'un mois, la colonie est très pâle et peu fertile.

Lévulose :

W au bout de quatre jours fournit un mycélium aérien net avec des pycnides faiblement rosées ; au bout de neuf jours, la colonie devient plus foncée ; le mycélium aérien persiste au neuvième jour, au seizième, au trentième jour; la colonie est alors devenue fortement glycogénique avec un mycélium aérien très fertile.

V, au bout de cinq jours, fournit un mouchet central en forme de dôme consistant en mycélium aérien blanc ; la colonie, âgée d'un mois, est nettement moins glycogénique, moins fertile que W ; les pycnides y sont distribuées sporadiquement ; on note un secteur dans le mycélium aérien.

Galactose :

W se comporte au quatrième, neuvième, seizième et trentième jour de sa culture comme sur lévulose ; la colonie finit par être très foncée.

V se développe aussi d'une façon analogue à sa culture sur lévulose : seul, le mycélium aérien est plus gris. Au bout d'un mois, la colonie est demeurée pâle et un peu moins fertile que W. L'examen au quarante-huitième jour montre une colonie glabre foncée ; les espaces interpycnidiaux doivent leur couleur foncée aux faisceaux de hyphes brunes qui réunissent les pycnides.

Mannose :

La race W montre, au cinquième jour, un mycélium aérien plus faible que sur les deux autres sucres, lévulose et galactose. Au bout de neuf jours, cette différence s'égalise en ce sens que la culture devient pareille à celle des deux autres sucres ; au bout d'un mois, la culture est foncée.

V se comporte comme sur les deux autres sucres; à l'âge d'un mois, la colonie est encore pâle.

Lactose :

La race W donne, au bout de douze jours, une colonie foncée ; la teinte augmente ; au quarante-huitième jour, la colonie est ponctuée de pycnides noires.

V fournit aussi une culture foncée avec un secteur blanc ; au bout de quarante-huit jours, la colonie est devenue ponctuée de pycnides noires. Le secteur qui se détache par son mycélium aérien est petit, mais ne disparaît pas avec le vieillissement de la colonie. Le lactose est en somme un milieu très peu différenciel.

Il en est tout autrement du saccharose.

Saccharose :

W au bout de douze jours donne une culture foncée ; au bout du quarante-huitième jour, la colonie est demeurée glabre, chagrinée, visqueuse, pigmentée partout. Les pycnides y sont nombreuses et régulièrement distribuées ; cependant, il y a lieu de noter qu'elles fournissent peu de pycnospores.

V, au bout de douze jours, donne une colonie blanc-beige ; au bout de quarante-huit jours la culture se présente comme une colonie glabre, chagrinée, visqueuse, incolore, sauf en quatre plages marginales, un peu plus foncées où les pycnides sont colorées. Il y a pourtant partout, par minuscules plages, des zones de pycnides pâles, quasi invisibles. Ces pycnides sont presque stériles ; même par compression, elles ne fournissent qu'à grand-peine quelques cellules-spores (voir figure 21 pl. IV) ; il en est de même d'ailleurs pour V sur Coonagar au maltose.

Une seconde série de cultures a confirmé ces résultats qui font du saccharose une sucre différenciel pour V et W.

V montre la capacité de fournir quelques secteurs foncés du type W. Un autre milieu, dit agar-amidon (3 % amidon soluble + 1 1/2% agar-agar) a donné pour la race :

W au bout du quatrième jour un mycélium très faible et aucune pycnide ; au bout de neuf jours, la colonie est glabre, de couleur brunâtre avec quelques points noirs ; au seizième jour, pas de mycélium aérien, colonie beige-olive, sans pycnides visibles ; au bout d'un mois, culture foncée.

V est glabre au bout de cinq jours ; la couleur passe du beige

à olive pâle au seizième jour ; à un mois d'âge, la colonie est demeurée pâle.

On en conclut que V n'est pas aussi adaptée à se servir des polysaccharides pour procéder à l'accumulation de réserves chromogènes.

En résumé, sur milieu sans sucre, V et W diffèrent principalement par la fertilité de W, les caractères de pigmentation et de gazon ayant disparu.

Les pentoses sont des sucres particulièrement favorables aux deux races ; arabinose est plus assimilable encore que xylose ; la fertilité de W et sa capacité de pigmentation intracellulaire, le distinguent de V qui fournit pourtant un gazon sur ces pentoses. Sur les hexoses, W fournit des cultures pigmentées fertiles et munies de gazon ; lévulose, galactose et mannose sont d'égale valeur ; ce dernier légèrement moins propice au développement. V est toujours plus pâle et moins fertile. Des deux dissacharides, seul le saccharose est différenciel, le lactose ne l'étant pas. Nous donnons ci-après une table des chiffres (en mm.) de la croissance en diamètre des deux races sur différents milieux. On ne voit guère de différence pour V entre les sucres employés : maltose est le plus favorable ; les milieux riches en azote augmentent la vitesse d'extension.

W n'est pas aussi sensible à l'addition d'azote; la vitesse de croissance est pour ainsi dire partout la même.

Croissances en diamètre de V et W sur Coonagar avec différents sucres

	Millimètres.					
V W	6	25	60	64	85	Sans sucre (Coon)
V W	12	15	30	34	50	Arabinose (Coon)
V W	12	15	30	36	52	Xylose (Coon)
V W	12	18	34	40	64	Lévulose (Coon)
V W	12	18	32	40	57	Galactose (Coon)
V W	10	16	30	35	57	Mannose (Coon)
V W	14	14,5	30	37	51	Amidon-agar
V W	20	29	49	—	75	Coonagar normal
V W	15	22	48	64	85	Coonagar au tartrate d'ammonium
V W	15	28	40	60	60	Coonagar au nitrate d'ammonium
Jour	1e	5e	9e	12e	16e	

§ 11. — AZOTE.

Les mêmes recherches que celles exécutées pour les sucres furent faites à propos de l'azote. Nous étudions ici la manière de se comporter des différentes races,quand on diminue la teneur en asparagine de 100% à 0% de la quantité totale prévue. La cause d'erreur due aux matières protéïques introduites avec l'agar, est très faible.

Effets sur la croissance en diamètre.

Il suffit d'examiner le graphique (figure 22) pour voir que les obliques s'abaissent de gauche à droite, à l'inverse de ce qui se passait pour la graphique 20 relatif aux sucres ; ces deux graphiques, 20 et 22, sont les expressions de deux expériences en tous points identiques ; conditions extérieures, concentrations de la nourriture et durée ; elles ne diffèrent que par le facteur variant azote, en l'ocurrence, pour ce dernier graphique 22.

A une diminution progressive de l'azote assimilable, offert ici sous forme aminée, correspond une augmentation de surface de la colonie du champignon ; cette règle est valable pour les races : α, G et γ, ainsi que le montre le graphique de la figure 22.

Le tableau suivant fournit quelques chiffres concernant la vitesse de croissance en diamètre de la race γ sur des milieux Coonagar variant par la teneur en azote.

Jours :	100%	75%	50%	33%	25%	12,5%	6%	0%
4me	15	15	15	15	15	15	14	18
9me	38	37	37	35	41	40	40	48
13me	57	55	55	57	57	59	60	70
23me	83	81	83	85	85	85	85	85

Les quantités d'asparagine contenues dans chacun de ces différents milieux, sont converties en valeur absolue dans la table suivante :

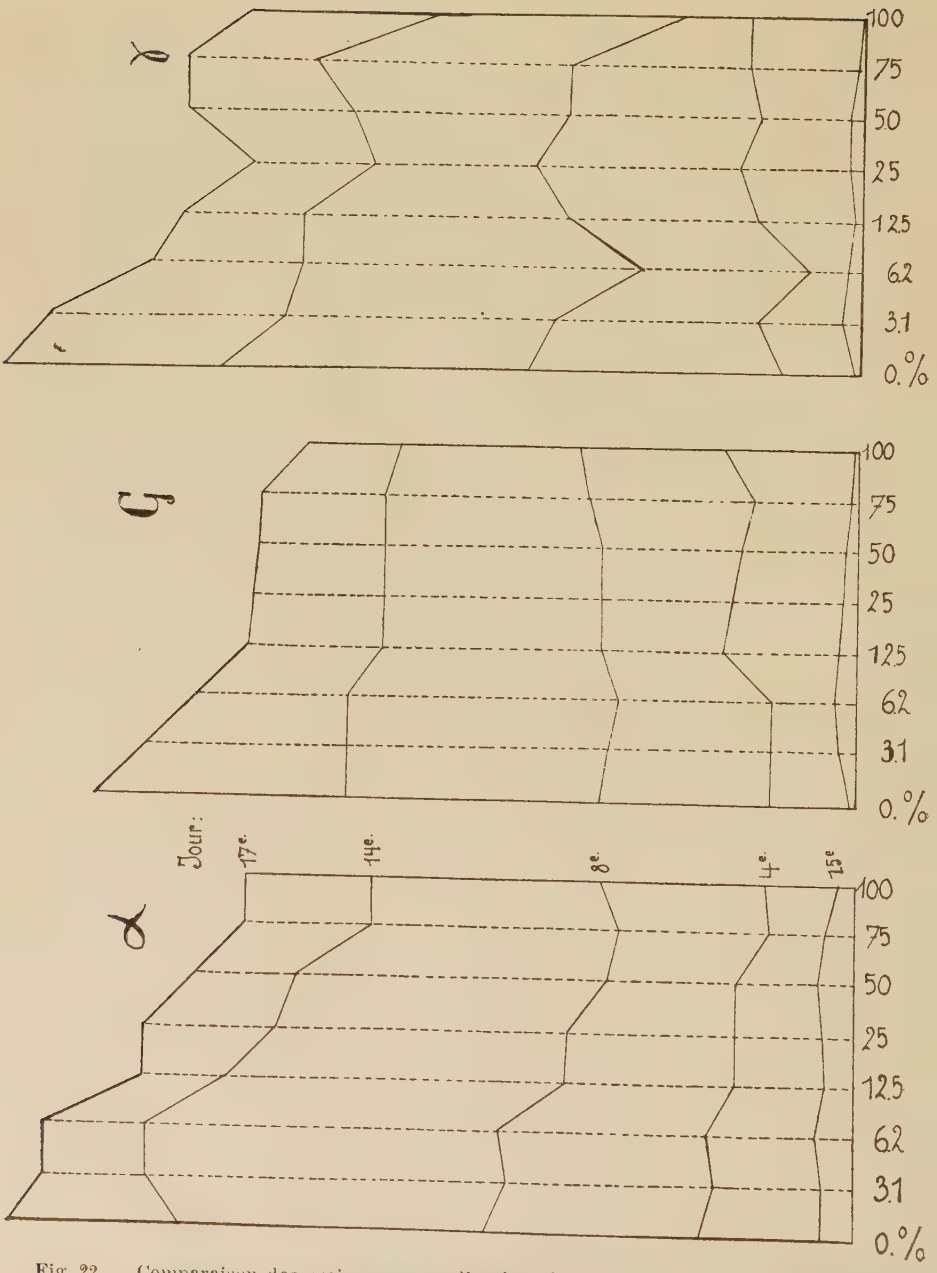


Fig. 22. Comparaison des croissances en diamètre des races α, G, γ, sur des milieux Coonagar où la teneur normale en asparagine varie suivant le % indiqué.

Concentration		
Relative		*Absolue*
100 %	=	0,266 ‰
75 %	=	0,199 ‰
50 %	=	0,133 ‰
33,3 %	=	0,089 ‰
25 %	=	0,067 ‰
12,5 %	=	0,034 ‰
6,25 %	=	0,017 ‰

Cette série correspond à la photographie de la figure 24 pl. V. faite à l'âge de 23 jours. Au neuvième jour, la colonie 100% est rose-brunâtre ; 75% brunâtre rosé ; 50% brunâtre rosé, puis on passe à brun foncé.

Les chiffres du tableau suivant montrent que les races V et W se comportent de même, c'est-à-dire qu'à la diminution de l'azote assimilable correspond une plus rapide extension du mycélium.

	W			V		
Azote	jours			jours		
	4me	9me	13me	4me	9me	13me
0%	18	49	73	18	45	67
6%	18	44	67	17	40	61
12%	18	44	65	19	42	60
25%	20	45	62	20	40	60
33%	19	45	63	19	41	59
50%	17	44	59	17	40	59
75%	18	42	60	17	42	60
100%	18	44	62	18	43	62

(% de la quantité d'asparagine prévue par le milieu de Coon. Mesures des diamètres en millimètres).

La diminution, et surtout l'absence totale de nourriture azotée, détermine une augmentation de l'aire coloniale ; cette plus grande extension correspond à une sorte de faim en azote de l'organisme qui s'étend pour gagner des plages nouvelles, au fur et à mesure qu'il a épuisé celles du centre. Il y a là un chimiotactisme bien défini.

Je me garde de dire qu'il y a ici augmentation de masse ; il ne s'agit que du diamètre colonial. L'abondance mycélienne est beaucoup diminuée, le réseau étant plus lâche. Les effets sur la qualité et la composition du mycélium seront d'ailleurs discutés dans un prochain paragraphe. Signalons encore que c'est surtout entre 12% et 0% de l'azote total du milieu, que se manifeste la plus rapide augmentation du diamètre. Les premiers jours du développement colonial marquent peu de différence entre un milieu riche ou pauvre en azote.

Effets sur le mycélium aérien (gazon).

D'une façon générale, la diminution et l'absence d'azote affectent la vigueur de la végétation aérienne ; elle peut même disparaître complètement : G, α ; il en est de même pour V et W ; la question ne se pose pas pour γ qui est glabre. Ce n'est guère qu'entre 6% et 0% de l'azote aminé présent que la disparition de la végétation aérienne se marque ; elle est toujours moindre et moins progressive que celle causée par la réduction du sucre. Nous donnerons ici, à titre de complément, quelques notes à propos du mycélium aérien de cultures sur milieux dépourvus d'azote.

α : 4me jour : Colonie absolument glabre (25 mm.).
7me jour : Colonie absolument glabre (41 m..).
70me jour : Colonie couverte d'un mycélium aérien, cotonneux, comme un feutre de couleur beige-café au lait ; de petites pustules du milieu, éparses dans la colonie, sont recouvertes du même feutrage.

G : 4me jour : Colonie absolument glabre (30 mm.).
7me jour : Colonie absolument glabre (48 mm.).
70me jour : Colonie couverte d'un mycélium aérien beige-gris, constitué de mailles entre lesquelles on aperçoit le brun du substratum. La colonie a un aspect chagriné.

γ : 4me jour : Colonie absolument glabre (25 mm.).
7me jour : Colonie absolument glabre (43 mm.).
70me jour : Colonie couverte par un fin mycélium aérien gris-plomb, constitué par un réseau très lâche de cordons mycéliens. Il y a donc lieu de conclure que des cultures très âgées des races α G et γ fournissent des gazons typiques pour chacune.

Ces végétations aériennes secondaires (v. fig. 23 pl. IV) proviennent en majeure partie de la germination des hypnocystes et de germinations nées directement sur les pycnides. Ces gazons sur milieu dépourvu d'azote, n'ont jamais l'importance de ceux qui se forment immédiatement dans des conditions normales.

Effet sur la couleur des colonies.

La disparition de l'azote assimilable dans le milieu de culture détermine un noircissement progressif de la colonie ; ceci est donc l'inverse de ce qui a lieu quand le sucre diminue. Sur un milieu à 100 % d'azote aminé (asparagine), la colonie demeurera claire, à peine pigmentée, sauf aux lieux de concentration de pycnides ; une colonie de même âge, sur un milieu identique mais quasi dépourvu d'azote sera complètement noire.

Ceci est particulièrement visible dans la série de cultures de la race γ sur des milieux variant par la teneur en azote. L'examen de la fig. 24 pl. V. révèle une pigmentation des disques coloniaux qui diminue de gauche à droite ; c. à. d. que si on examine la culture de droite, âgée de 23 jours sur un milieu Coonagar complet (azote 100 %) on voit une colonie blanche ponctuée de pycnides foncées ; au fur et à mesure que la teneur en azote diminue on voit les colonies se border d'une zone noire (75 %) qui s'élargit (50 %) pour enfin couvrir la colonie tout entière (33 %) ; la teinte devient plus foncée jusqu'à 6% ; il y aura lieu de noter qu'en l'absence totale d'azote, la colonie est plus claire que ne le supposerait la gradation des teintes. On peut faire l'hypothèse, que le défaut complet d'azote se fait sentir si fortement, que les substances azotées manquant, l'élaboration des pigments est limitée.

La race γ se prête tout particulièrement à la démonstration pour la raison que tout le tissu interpycnidial est hyalin, tandis que les races α et G (dont le mycélium est mélangé de hyphes à cellules pigmentées et à cellules hyalines) se prêtent moins bien à cette démonstration. Au contraire, les races V et W se comportent d'une façon analogue à γ, ainsi que le prouve la photographie (fig. 25 et 26 pl. V). Là encore la pigmentation de la colonie augmente du milieu à 100 % d'azote jusqu'au milieu à 6 % ; le milieu à 0 % échappe partiellement à la règle, étant donné les conditions toutes spéciales créées par la carence complète de l'azote.

Un autre document vient encore confirmer les précédentes

observations. Il s'agit de la photographie (fig. 27 pl. V) de la race instable B ; le noircissement augmente avec la diminution de l'azote ; mais ici l'organisme produit les hyphes pigmentées par secteurs ; la progression est marquée par l'intensité de coloration et le nombre des secteurs.

Nous donnerons, à titre de complément, les observations faites à propos de V et W : les colonies de la race W foncent progressivement au fur et à mesure que l'azote diminue ; il faut cependant mentionner que le vase Petri 0 % azote se comporte presque toujours différemment ; c. à. d. que si la diminution d'azote entraîne la formation des hyphes pigmentées, l'absence quasi totale (milieu agarisé) d'azote réprime légèrement cette tendance, l'azote devenant si rare qu'il y a difficulté à produire les produits mélaniques qui accompagnent les cellules hypnocystes. Quant aux pycnides, elles disparaissent rapidement avec la diminution de l'azote ; le mycélium aérien demeure égal, puis diminue à 6 % ; à 0 % la colonie est glabre.

Les couleurs au neuvième jour sont les suivantes : 100 % : incolore ; 75 % : presque incolore ; 50 % : faiblement olive ; 33 % : olive ; 25 % : olive ; 12 % : olive foncé ; 6 % : olive foncé ; 0 % : beige-olive.

La race V passe au fur et à mesure que l'azote diminue de 100% à 0 % du blanc au beige-olive ; ici encore la colonie sur milieu à 0 % d'azote fait exception, le mycélium est invisible, hyalin.

Les couleurs sont : 100 % : blanc ; 75 % : blanc ; 50 % : blanc-trouble ; 33 % : beige très pâle ; 25 % : beige presqu'incolore ; 12 % : olive ; 6 % : beige-olive ; 0 % : invisible. Au bout de 13 jours on peut dire que 100 % est rose et 6 % foncé.

En résumé, la série de W produit beaucoup plus rapidement et plus intensément du glycogène + pigment par absence d'azote. que ne le fait la série de V ; à vrai dire, il n'y a qu'une différence d'intensité entre ces deux manières de se comporter.

Effet sur la morphologie.

L'action la plus marquée de la diminution de l'azote est celle exercée sur la fertilité du champignon. A la réduction de l'asparagine correspond une réduction de l'appareil conidial ; les pycnides diminuent de grandeur et leur concentration par unité de surface se réduit considérablement.

Ce phénomène est général ; les races α, G, γ, V et W le manifestent. C'est encore chez la race γ qu'on peut le plus facilement l'évaluer, vu l'absence de mycélium aérien.

La fig. 28 de la planche V montre une série de photographies prises au moyen du « Mica » de Leitz, directement sur les colonies développées sur des milieux variant par la teneur en asparagine ; chaque photographie a été prise au hasard dans le champ colonial à cm. 2,5 du centre. La photographie de droite (Coonagar normal 100 % d'azote) montre de grosses pycnides noires sur un fond clair ; 75 % semble tout aussi favorable ; à 50 % la réduction du nombre et de la grandeur est sensible ; mais, c'est surtout entre 25 % et 0 % que la stérilité apparait visiblement. On s'étonnera peut-être de ne pas voir les espaces inter-pycnidiaux plus foncés ; mais il faut se rappeler qu'il s'agit d'une micro-photographie faite au moyen d'un faisceau lumineux qui vient par-dessous et traverse la colonie.

Nombre de pycnides.

Dans le tableau suivant, nous avons exprimé la diminution du nombre de pycnides par unité de surface ; ces chiffres ont été calculés comme suit : on photographie des colonies du Phoma γ sur des milieux variant par la teneur en azote ; toutes les autres conditions sont égales et l'on tâche encore de choisir des situations homologues dans les différentes colonies.

La portion découpée par le système optique dans le champ colonial est considérée comme unité de surface, et l'on dénombre les pycnides sur les épreuves ; ce dénombrement n'est pas toujours facile à cause des états d'agrégation, ou, de la difficulté de distinguer une très petite pycnide d'une grosse hypnocyste. Néanmoins les chiffres obtenus montrent la proportionalité entre l'azote disponible et la production de pycnides. Il eût été intéressant de pouvoir faire des mesures analogues pour α et W ; mais l'abondance du mycélium aérien l'empêchait complètement.

Nombre de pycnides par unité de surface	0	0	7,5	3	10	14	20	23
% de la teneur normale en Asparagine dans le mileu de Coon	0	3	6	12	25	50	75	100%

A mesure que l'azote diminue, la production de pigments cellulaires s'accuse de telle façon que la colonie prend la teinte foncée sus-décrite. La couleur de la colonie n'est pas due qu'à l'amoncellement des hyphes brun-olive ; la présence de pycnides et des éléments hypnocystes y contribue aussi. Les pycnides manquent complètement sur milieu sans azote ; ce sont les nombreuses figures des hypnocystes qui jouent le principal rôle. Ce sont surtout sur ces milieux qu'on peut observer les formes variées des appareils à cellules durables : les formes en massues noires (muriformes) sont les plus fréquentes.

L'examen attentif des clichés de gauche de la figure 28 pl. V montre déjà que sur milieu pauvre en azote une foule de petites figures se sont substituées aux pycnides disparues. On peut produire à volonté ces hypnocystes en cultivant le champignon sur un milieu pauvre en azote. La fig. 29 pl. VI montre quelques types d'hypnocystes photographiées sur milieu sans azote, produites par les races α, G et γ.

Ces figures ne se retrouvent que difficilement dans les cultures de α sur milieu complet, et pour ainsi dire jamais dans les cultures de G et γ sur milieu complet.

La race α est celle qui produit le moins d'hypnocystes; G et γ qui en temps normal n'en forment pas, en produisent abondamment, G surtout. Il y a lieu de signaler que γ modifie ses tissus interpycnidiaux par la création de hyphes colorées qui n'existaient pas au début sur milieu complet.

La production d'hypnocystes peut n'être pas immédiate ; par exemple des cultures de γ âgées de 17 jours les montrent, tandis qu'elles ne se sont pas encore développées chez G et α. Comme nous l'avons déjà signalé, les éléments hypnocystes sont riches en glycogéne, et ce dernier toujours accompagné du pigment qui est cause de la noirceur des hypnocystes.

§ 12. MILIEUX RICHES EN AZOTE.

Dans le milieu de Coon, on a substitué du tartrate d'ammonium (gr. 1,67 %) à l'asparagine, et, dans une deuxième expérience, du nitrate d'ammonium (gr. 0,8 %.).

Concentration des sels d'azote : N/100. On appelle le premier milieu : Coon-tartrate agar, le second Coon-nitrate agar. Les deux

se sont trouvés favorables à la croissance des races de Phoma, mais désavantageux pour les différencier.

La vitesse de croissance sur le milieu Coon-nitrate-agar est la même pour α et γ, G montre un retard sur les deux autres :

Diamètre de :	α	G	γ
aux 3me jour	9 mm.	4 mm.	8 mm.
4me jour	17 mm.	16 mm.	16 mm.
7me jour	30 mm.	25 mm.	30 mm.
10me jour	40 mm.	33 mm.	40 mm.
15me jour	60 mm.	50 mm.	60 mm.

D'une manière générale, ces milieux donnent lieu à des colonies abondamment fournies en pycnides, totalement dépourvues de mycélium aérien et constituées par des hyphes non pigmentées. Ce dernier caractère s'observe très nettement quand on compare les tubes-cultures des différentes races qui ont poussé sur milieu Coon-agar à base de nitrate ou de tartrate, avec les mêmes cultures développées sur amidon agar. Ces dernières sont noires tandis que les premières sont roses.

Les races V et W ont donné sur milieu Coon-tartrate-agar les végétations suivantes : W, 4me jour : abondant mycélium aérien blanc ; le dessous de la colonie a une tache rose : 9me jour, culture rose, en raison des nombreuses pycnides ; un léger duvet blanc recouvre la colonie ; au 16me jour le mycélium aérien a encore diminué.

V, au bout de 5 jours, fournit un mouchet central blanc très net : au 12me jour on a des pycnides rose-pâle ; le mycélium interne incolore est plus dense que pour W ; un léger duvet blanc couvre la colonie.

Sur le milieu Coon-nitrate-agar, W montre au bout de 4 jours un riche mycélium aérien blanc; au 9me jour, la colonie est devenue glabre et couverte de pycnides roses au centre ; au bord reste un duvet marginal.

V ne se distingue que par la non-coloration de ses pycnides.

Milieu Peptone-agar.

Un bouillon artificiel de peptone 3 % dans l'eau ordinaire, solidifié par de l'agar (1,5 %) constitue ce milieu riche en azote et

dépourvu de sucres. La culture de α y donne un mouchet central de mycélium aérien incolore ; sur le reste de la colonie couverte de pycnides rose-saumon, il n'y a pas ou peu de mycélium aérien.

G et γ ont un mycélium plus pauvre encore, ras, et partout des pycnides abondantes. Somme toute, ce milieu est très défavorable à la différenciation des races ; aucune n'acquiert de pigment intracellulaire sur ce milieu dépourvu de sucres.

§ 13. MILIEUX PAUVRES EN AZOTE.

Dans le but de contrôler les effets que nous avonsre connus être dus à la diminution de l'azote disponible, nous avons cultivé les mêmes souches sur des milieux de culture pauvres en substances azotées. Parmi eux signalons : Amidon soluble 3 % agarisé, moût-agar, pomme de terre agar, pomme de terre pure, pain. Sans être complètement dépourvus d'azote, les deux derniers en particulier, ces milieux se caractérisent cependant par la prédominance de la nourriture hydrocarbonée.

Amidon soluble 3 % agarisé.

La vitesse de croissance en diamètre est à peu près la même que celle mesurée sur des milieux riches en azote (peptone-agar, Coon-agar à base de nitrate d'ammonium). Les cultures noircissent toutes en vieillissant, par accumulation de réserves chromogènes dans les cellules.

L'examen des colonies indique l'absence de mycélium aérien ou sa réduction à une délicate trame de hyphes interpycnidiales. Il y a encore formation de pycnides peu nombreuses chez les trois races α, G et γ.

En examinant la fig. 31 pl. VII, on peut se rendre compte de la réduction des pycnides sur milieu amidon-agar par comparaison avec la figure donnée par la même race α ou γ sur milieu Coonagar complet. On notera aussi en passant la différence des pycnides de α et γ sur le milieu type. Les pycnides que l'on trouve sur le milieu à base d'amidon, sont à vrai dire bien modifiées.

Ce ne sont plus que des nœuds stériles consistant en boules de cellules serrées d'où irradient les hyphes ; ces figures ne montrent point d'ostiolum et l'on n'observe aucune pycnospore ; on a chez

ces pseudopycnides, ainsi que je les ai appelées, le terme de transition de la pycnide à l'hypnocyste.

Par contre, la production de hypnocystes muriformes est abondante sur milieu agar-amidon. Les races α et γ montrent des figures très nettes ; G n'en montre pas. Les corps en massues sont de plus petite taille chez γ.

Milieu pomme de terre agarisé.

Ce milieu, après nous avoir servi au début de nos expériences, fut plus tard abandonné. Notons, cependant, que le premier secteur obtenu, d'où est dérivé γ, l'a été sur un milieu pomme de terre agar, soit relativement pauvre en azote. Des cultures répétées de α, race sélectionnée plusieurs fois, ne nous ont jamais redonné de secteur γ sur ce milieu, ni sur d'autres d'ailleurs.

Milieu de pomme de terre.

On prend une volumineuse pomme de terre, cylindrique si possible, puis on y découpe 5 à 6 rondelles épaisses d'un cm. environ ; ces sections, placées dans des vases Petri, sont stérilisées à 120° deux fois ; il faut avoir soin de mettre un peu d'eau au fond du Petri. On a, de cette manière, 5 à 6 milieux suffisamment comparables, sur lesquels on ensemence les différentes races.

Il est intéressant de remarquer ici que pour distinguer aisément les races, il y a toujours avantage à se servir de milieux naturels (pomme de terre, pain, etc.) que de se servir de milieux synthétiques. Les sections de pomme de terre fournissent des végétations bien distinctes pour les races suivantes :

α, donne au bout de six jours une colonie comme une tache, de couleur rose-clair (avec des teintes olive mêlées), de consistance visqueuse ; la couleur peut aller jusqu'à fraise écrasée. Au centre, la surface est bosselée par des grumeaux ; un mouchet central de mycélium aérien constitue parfois un plumet gris brun. A ce moment, il n'y a pour ainsi dire pas de mycélium aérien.

G, à six jours, montre une colonie grumeleuse, couverte sur les mamelons d'un fin et court mycélium aérien blanc ; ce gazon diminue l'intensité de la teinte générale rose-saumon de la colonie ; ce gazon peut se développer plus encore, jusqu'à couvrir la colonie d'un mycélium blanc.

γ à six jours, ressemble beaucoup encore à G ; le mycélium aérien a l'air d'une crinière et consiste en touffes plumeuses blanches. La photographie (voir fig. 32 pl. VI) donne une idée des différences manifestées par la culture sur pomme de terre. Il faut remarquer que chez γ, la zone visqueuse rose-saumon, qui forme ces plissements sur le milieu, est la portion fertile couverte de pycnides ; il en est de même pour α ; ces végétations deviendront noires par la suite. On peut dire que G, par ses caractères coloniaux, se trouve à mi-chemin de α et de γ.

On voit à la fig. 33 pl. VIII, qui représente un stade plus avancé sur pomme de terre, que : γ est devenu noir foncé et glabre, à l'exception du mouchet blanc ; que α est devenu plus foncé et a conservé un mycélium aérien ; que G n'a pour ainsi dire pas formé de pigments sur ce milieu pourtant favorable à la production de réserves chromogènes.

Les races V et W et les souches B et N, cultivées sur sections de pomme de terre, nous ont donné pour V et B des végétations stériles blanches et pour W et N des végétations fertiles et pigmentées, ainsi que le montre la figure 34 pl. VIII.

Milieu à base de pain.

La préparation de ce milieu consiste à stériliser une macération de 12 gr. de poudre de pain sec dans 100 cm3 d'eau. Sur ces milieux de consistance visqueuse, les *Phoma* se sont bien développés et les différences entre races s'y accusent fortement.

Race α : Au bout de sept jours, on note l'apparence coloniale suivante (5 colonies identiques) : au centre se trouve un mouchet de mycélium aérien ; il a la forme d'une courte gerbe en chou-fleur ; tout autour est une zone glabre de nature visqueuse et de couleur rose-vif ; c'est la région fertile, couverte de pycnides ; au bord se trouve un anneau de mycélium aérien blanc. Au vingt-et-unième jour, les colonies ont peu changé et sont demeurées homogènes. Au vingt-huitième jour, on remarque çà et là quelques petites plages blanches insignifiantes.

Race γ : (5 colonies identiques). Le septième jour, au centre, se trouve un plumet bifide ou trifide très caractéristique pour γ ; il est constitué de hyphes du mycélium aérien qui se sont aggrégées pour former le dit plumet de couleur brune. Tout autour, la colonie

est constituée par un tissu glabre, visqueux rose, produit par l'agglomération des pycnides.

Le vingt-et-unième jour, rien n'est changé ; quelques rares plages blanches ; la colonie, au vingt-huitième jour est devenue grumeleuse et de couleur noir foncé, sauf en ces quelques plages demeurées blanches.

Race G : La colonie est partiellement couverte d'un léger mycélium blanc qui alterne avec les plages glabres roses ; l'apparence est sectorienne dès le septième jour. Au vingt-huitième jour, on note une surface mycélienne simplement couverte de plages blanches comme des îlots régulièrement distribués. La race W donne une apparence identique. V, au contraire, est simplement constitué par un mycélium aérien blanc, sans zone fertile.

Il y a une différence nette entre les végétations qui se sont développées sur le milieu de pain (poudre) et celles développées sur des rondelles de pain frais, stérilisées.

Les races α et G y développent des végétations très semblables, γ un type tout à fait différent (v. fig. 35 pl, VIII). Sur milieu de pain frais stérilisé, α développe un mouchet central de mycélium aérien de couleur vert de gris, entouré d'une zone fertile glabre couleur rouge-rose. G a moins de mycélium aérien et la partie fertile est plus rouge.

γ fournit une colonie glabre (ou presque) et couverte de pycnides qui confèrent une teinte générale brun foncé à la colonie. La couleur rose ou rouge est due à l'agglomération des sacs gluants des pycnides. Pour la race γ, la couleur foncée n'est pas due seulement aux pycnides jaunes-brunes, mais aussi à la grande quantité d'hypnocystes en forme de massues allongées brunes qui se sont développées. Il y a en outre, dans le mycélium interne et à l'entour des pycnides, abondance de hyphes pigmentées, ce qui ne se retrouve pas au début, tout au moins chez α et G.

Les mêmes cultures, mais âgées de plus d'un mois, sont alors toutes couvertes d'un mycélium aérien abondant : α a un gazon devenu brun ochracé ; G a un gazon devenu lie de vin ; γ a finalement produit un gazon vert de gris. L'examen anatomique de ces gazons révèle chez : α, un mélange de hyphes à cellules hyalines et de hypes à cellules pigmentées, ces dernières formant la majorité ; on n'observe pas d'hypnocystes.

G montre une majorité de hyphes hyalines, dont beaucoup ont

différencié un chapelet terminal composé de conidies hyalines rondes. Ces petites cellules sont, à proprement parler, la forme aérienne de figures retrouvées sur d'autres milieux dans le mycélium interne, figures que nous avons appelées hypnocystes en chaînettes (oïdium). Il arrive souvent, en effet, que les hypnocystes sont précédés par la désarticulation du filament en une chaînette oïdium; quelques cellules du centre se divisent encore pour former le noyau de ce qui constituera plus tard l'hypnocyste ; or, il arrive souvent que le procès s'arrête en cours de route, au stade oïdium, avant même que le pigment caractéristique des hypnocystes soit apparu ou que l'hypnocyste ait développé sa forme définitive. (Voir fig. No 11 ; voir aussi pour les oïdium aériens la figure No 43, Pl. IX dans le paragraphe No 18.) Nous avons, dans le mycélium aérien de G, un phénomène analogue.

Le gazon de γ, tardivement apparu sur milieu pain, est constitué par des hyphes à cellules complètement hyalines ; on ne trouve pas d'hypnocystes comme dans le mycélium interne.

Des cultures faites avec les races V et W, sur le milieu à base de poudre de pain, nous donnent les résultats suivants :

V, inoculé à partir d'une culture monosporée donne, au bout d'une semaine, un mouchet aérien blanc de neige ; le reste de la colonie a la couleur gris beige du milieu (4 boîtes identiques).

W fournit 5 cultures roses, nettement distinctes de V ; le mouchet est globuleux et, d'une façon générale, le mycélium aérien plus pauvre ; on voit là que W est tout à fait identique à G.

Une autre série de cultures sur pain nous montre W analogue à G ; au bout du septième jour, la culture est rose et partiellement couverte de mycélium aérien blanc. Ces plages, manifestations sectoriennes, finissent par être des îlots nombreux de mycélium aglycogénique au milieu de la culture foncée (vingt-huitième jour).

Quant à V, la colonie demeure homogène (vingt-huitième jour) et reste totalement aglycogénique dès le début.

Milieu moût-agar.

Le moût de raisin stérilisé, dont nous nous sommes servi, est fortement acide. Il faut, lors de la confection du milieu, neutraliser le moût, dont la propriété acide hydrolyserait l'agar à la température de l'autoclave. En milieu neutre ou légèrement alcalin, le liquide devient brun, comme une infusion de thé. Pour éviter cette

couleur défavorable à l'inspection des cultures, nous avons préparé un moût-agar acide, en stérilisant séparément l'agar et le moût, et en ne les mélangeant qu'à la fin de l'opération. Les cultures ont différé d'apparence sur chacun de ces milieux, ce qui nous engage à décrire séparément les deux essais.

1. **Moût-agar neutre.**

La race α donne une colonie glabre, sauf au centre où s'élève un mouchet ; les pycnides sont densément réparties, enfoncées dans le milieu et donnent à la colonie une couleur brun-roux.

La race γ donne une colonie munie d'un mycélium aérien ; les pycnides sont brunâtres, noires et suspendues dans le mycélium au-dessus du substratum. La race G se rapproche beaucoup de α ; seule, l'irrégularité de la couleur coloniale l'en distingue.

La race W fournit une colonie couverte d'un mycélium aérien laineux ; elle est fertile et se rapproche de α.

La race B fournit sur ce milieu une colonie qui ressemble complètement à α.

La race n est un pur γ.

Au bout d'un mois, toutes ces apparences ont convergé vers un type général : colonie noir foncé où le souvenir des mycéliums aériens, seul, permet encore de reconnaître α de γ, etc.

2. **Moût-agar acide.**

L'examen fait sur ces cultures âgées de dix jours montre :

Pour la race α, une colonie (diam. 28 mm.), couverte d'un mycélium aérien abondant, élevé, en forme de dôme ; la couleur générale est blanche ; il y a cependant des arabesques en forme d'anses ouvertes à l'extérieur, qui ont une teinte couleur vert-jaune de penicillium. Ces figures sont très nettes, plus encore en examinant la colonie par transparence ; il n'y a point encore de pycnides visibles ; une deuxième colonie se trouve être identique, quoique les arabesques y soient moins prononcées.

Pour la race *G*, une colonie (diam. 30 mm.), munie de mycélium aérien en forme de dôme ; le centre est de couleur vert penicillium ; cette teinte s'atténue insensiblement jusqu'au bord blanc ; la colonie est stérile et parfaitement homogène ; un deuxième échantillon est identique.

Pour la race γ, une colonie sectorienne divisée en trois zones :

1. Partie dite normale, γ, consistant en un secteur aigu, glabre, très fertile en petites pycnides foncées noires densément distribuées à la surface de ce secteur à peine velu; 2. partie dite du type b consistant en un secteur quasi glabre, très fertile en petites pycnides brunes et glabres ; 3. partie stérile, consistant en un gazon de mycélium aérien blanc élevé. Ce gazon est teinté en vert au centre de la colonie.

Une seconde culture de γ se montre homogène et tout entière constituée par le gazon mycélien blanc élevé (5 mm.). Ce gazon, verdâtre au centre, recouvre une colonie parfaitement stérile.

La culture γ examinée au quinzième jour, permet de dire que le secteur fertile brun est bien du type b ; en effet, les pycnides y sont demeurées glabres et sont à demi enfoncées dans le milieu, tandis que, dans la portion γ normale, elles sont plutôt soutenues dans le réseau du fin mycélium aérien. C'est la différence observée lors de la production des races n et b (voir paragraphe No 20). En vieillissant, la différence entre γ et b du brun et du noir s'atténue par noircissement du brun. L'autre échantillon de γ, au quinzième jour, a généralisé la teinte verte sur tout le mycélium, sans autre modification.

Au bout de quinze jours, les colonies de α se sont couvertes d'un mycélium vert gris ; on note quelques secteurs marginaux en forme de coins ; ils correspondent à des zones plus foncées, tant pour le mycélium aérien que pour l'interne ; au trente-troisième jour, on remarque que les secteurs marginaux ont gagné le centre de la colonie et lui donnent alors une apparence étoilée. Ces bandes sectoriennes correspondaient à l'apparition des pycnides ; ces secteurs fertiles ont grandi de telle façon qu'à la fin, ce sont les minces régions stériles plus claires qui prennent, en séparant les premières, une forme sectorienne. Une seconde culture de α se comporte de la même manière.

Les colonies de G, au quinzième jour et au trente-troisième, ne manifestent rien de neuf, sinon que le mycélium aérien a verdi.

Races W et V sur milieu moût-agar.

Sur le milieu *moût-agar* neutre, la race W donne une colonie abondamment couverte d'un mycélium aérien, laineux; deux pla-

ges particulièrement denses en mycélium aérien font des taches sombres.

Le type V est incolore, stérile, avec un fort secteur très net de mycélium aérien blanc.

Plus tard, sur la colonie âgée d'un mois, W est devenu tout à fait noir, pointillé de pycnides ; la colonie est presque glabre, très fertile ; les secteurs du début sont devenus presque invisibles, et l'apparence est très analogue à celle fournie par la culture α, au point de s'y méprendre. Quant à la colonie de V, elle présente un mycélium aérien blanc, réparti en secteurs irréguliers ; peu de pycnides en somme (voir figure 36 pl. XI).

Une seconde série de cultures sur moût-agar acide, donne, au bout de dix jours pour V, l'apparence suivante : la colonie consiste en un disque de 26 mm. de diamètre, bordé par une zone glabre, chagrinée, légèrement visqueuse, incolore ; au centre, se dresse un mycélium aérien blanc-crème, de végétation crépue et non déliée comme un gazon mucoracé. Un deuxième échantillon de culture est semblable. La colonie de W ressemble à V, mais la zone glabre chagrinée est beaucoup plus large et l'îlot central de gazon est réduit à un large mouchet de végétation du type mucoracé. Une deuxième colonie de W est identique. Au dixième jour, il n'y a pas encore de pycnides visibles, ni chez V, ni chez W.

Au quinzième jour, la colonie de V a l'aspect d'une peau-voile, glabre, incolore, légèrement ridée suivant les rayons. Au centre se trouve un mycélium aérien incolore, de consistance crépue.

A cet âge, W se différencie par des secteurs, qui seront décrits au paragraphe No 20, une zone fertile destinée à couvrir la colonie. En fin de compte, le type pur V aura une colonie glabre, stérile, visqueuse, incolore, et W une colonie couverte d'un gazon mycélien vert foncé, recouvrant un tissu interne fertile. En résumé, le milieu moût-agar, pauvre en matières protéïques, se montre favorable à la production de filaments foncés et de pycnides noires. Les secteurs y apparaissent facilement et correspondent à une lente adaptation du champignon à son milieu.

§ 14. COMPARAISON DES CROISSANCES DE α, G, ET γ SUR MILIEUX DE CZAPEK AGARISÉ ET DE RAULIN LIQUIDE.

Czapek-agar [1] :

La richesse en azote de ce milieu fournit des cultures fertiles en pycnides.

α, au bout de quatre jours, donne sur Czapek-agar, un mycélium aérien en fourrure blanche ; une traînée glabre rose-rouge à brique consistant en pycnides, l'accompagne ; plus tard, le mycélium vire de couleur et devient vert. La zone fertile devient, plus tard, couleur caramel.

G fournit un mycélium aérien plus abondant ; quant à la couleur des pycnides, elle est olive, puis beige brun. En G, les pycnides sont moins humides, moins aggrégées qu'en α ; la répartition se fait aussi suivant des lignes tourbillonnaires ; les pycnides de G deviennent plus vite foncées que celles de α.

γ n'a pas de gazon, ou bien un très fin réseau en toile d'araignée ; les pycnides y sont de couleur brun clair. Plus tard, α, sur Czapek-agar, donne un mycélium aérien vert foncé ; sauf au cours du premier développement, on peut dire que les trois races se distinguent moins bien les unes des autres, que sur le milieu Coonagar ; G donnera un gazon gris verdâtre.

Milieu de Raulin acide, liquide.

Des cultures âgées de dix jours, en milieu liquide de Raulin acide, ont fourni :

Pour α, un mycélium en forme de peau chagrinée, immergé, incolore ; parfois en grumeaux non soudés.

Pour γ, un mycélium plus abondant, visqueux, comme un empois grumeleux. On voit, au contact du verre, les pycnides se former. Le milieu liquide est défavorable à toute différenciation.

§ 15. MESURES STATISTIQUES DE LA LONGUEUR DES PYCNOSPORES CHEZ LES RACES α, G, γ, V ET W.

Les méthodes biométriques révèlent souvent des caractères qui ont échappé à l'examen ordinaire d'un organisme. Aussi, avons-nous déterminé chez les différentes races, le mode de longueur des pyc-

[1] Voir à l'appendice la composition du milieu de Czapek.

nospores fusiformes ; les mesures ont été effectuées à la chambre claire sur un nombre variant de 250 à 350 cellules ; pour éliminer l'erreur de choix, toutes les cellules de chaque champs microscopique furent mesurées. La figure 37 indique, pour la race α, un mode de longueur correspondant au chiffre μ 4,75 ; la courbe est donc régulière, monomodale et ne présente aucun palier.

La race γ, issue par mutation de secteur de la race α, a le même mode de longueur μ 4,75 ; la courbe est également unimodale et régulière. Donc, les deux races α et γ, si différentes à bien des égards, ont des pycnospores de longueur identique.

La race G, issue par sélection d'une population de α, fournit, comme on le voit à la figure 37, une courbe plurimodale et irrégulière.

Le mode principal correspond à la valeur μ 4 ; le second mode revient à la valeur μ 4,75, signalée pour la race α. Les paliers, manifestés par la courbe, sont les indices de la variabilité propre à l'organisme G ; cette variabilité qu'annonce la méthode biométrique sera d'ailleurs pleinement vérifiée par les expériences ultérieures de culture.

On a souvent remarqué en biométrie qu'un caractère choisi arbitrairement, peut exprimer la stabilité ou l'instabilité de la race, pour ce qui est d'un ensemble de caractères. On admet alors, dans ce cas, que les caractères sont liés par paires ou par groupes et quand même chacun peut avoir sa variabilité relative propre, l'instabilité de l'un est liée à l'instabilité de l'autre.

Une fluctuation considérable caractérise la race G et la distingue nettement des races α et γ plus stables. Les races V et W, issues par mutation de secteur, V de G et W de V, donc toutes deux descendantes de G, ont donné les résultats suivants :

V, qui est un mutant de G, fournit une courbe monomodale de forme régulière dont le mode de longueur correspond à la valeur μ 4,1.

W, qui est par mutation de secteur de V, un retour vers le type originel G, fournit une courbe bimodale et irrégulière comme G ; le mode principal correspond à μ 3,42 et l'autre à μ 4,78. Il est curieux de constater que le mode unique de V se trouve être juste à mi-chemin des deux modes de W (fig. 37, p. 118).

Il faut noter ici, que la race V se rapproche, par la stabilité de la longueur de ses pycnospores, de la race γ ; c'est, comme s'il s'était effectué à ce point de vue une purification dans la descendance de G.

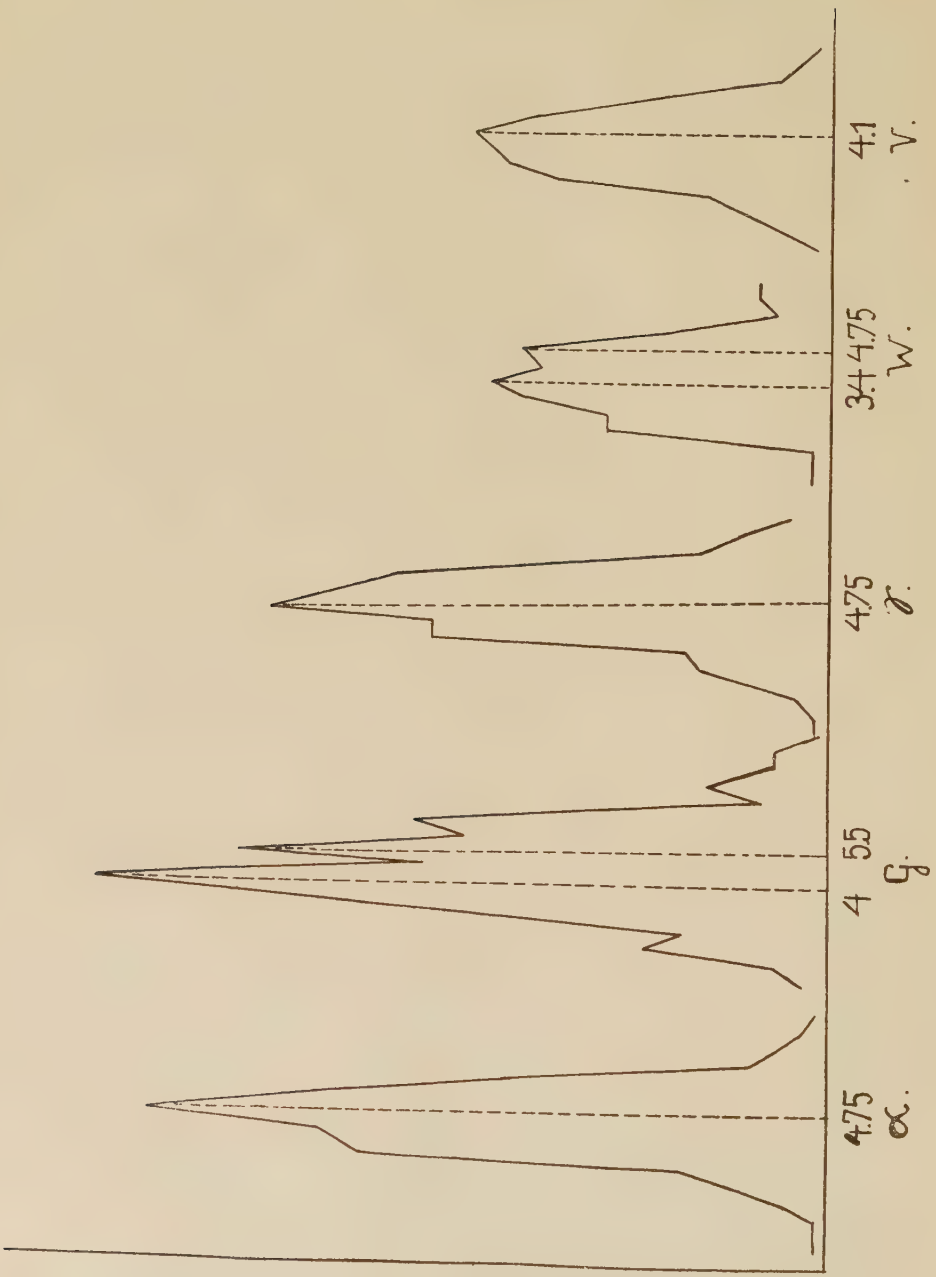


Fig. 37. — Courbes exprimant les valeurs statistiques de longueur des pycnospores chez les différentes races.

Le rapprochement de la race V vers la race γ est d'ailleurs confirmé par d'autres caractères : le type de la ramification des hyphes est le même chez V et γ ; les deux races ont un mycélium hyalin sur le milieu-type Coonagar. La race W participe, au contraire, des mêmes caractères que G, vers laquelle race elle retourne sans l'égaler cependant.

En résumé, on peut dire : races α et γ, longueur de la pycnospore μ 4,75, variabilité minime ; race V, longueur μ 4,1, variabilité minime. Races G et W, variabilité grande et amplitude de l'oscillation entre les deux modes principaux, allant de μ 4 à μ 4,75 pour G, de μ 3,42 à μ 4,78 pour W.

§ 16. LIQUÉFACTION DE LA GÉLATINE PAR LES DIFFÉRENTES RACES α, G, γ, V, W, B, N.

Nous avons comparé le pouvoir liquéfiant de la gélatine de ces races, en nous servant, pour l'estimation, de la mesure des quantités de liquide fourni par l'hydrolyse, faite par la culture sur milieu gélatinisé.

La technique employée est la suivante : On remplit un certain nombre de bouteilles de pharmacie, cylindriques, à fond plat, munies d'un étroit goulot et d'une contenance d'environ 100 cm^3, du milieu gélatinisé choisi ; cette quantité de milieu est mesurée de façon à ce qu'une fois le flacon couché latéralement, le niveau du liquide visqueux soit légèrement inférieur à celui de l'orifice interne du goulot, celà pour éviter l'écoulement. Les flacons sont remplis, bouchés au coton, stérilisés droits, puis couchés précautioneusement au sortir de l'autoclave, pour éviter que le milieu fluidifié ne mouille le coton ou n'humecte le reste des parois. La gelée prise, on relève la bouteille ; le milieu de culture rigide, en forme de section longitudinale de cylindre, offre une surface rectangulaire pour le développement colonial ; les deux tiers du fond de la bouteille sont francs de milieu et le liquide d'hydrolyse s'y accumule ; par aspiration, au moyen d'une pipette à boule, on peut le récupérer sans injurier la colonie et dans les conditions de stérilité nécessaires à la bonne marche de l'opération. L'inoculation doit être faite bien au centre de la surface milieu. Les résultats fournis pour l'hydrolyse sur milieu Coon-gélatine sont exprimés par le graphique figure 38.

Le milieu de Coon a été solidifé par la gélatine à raison de 15% puis purifié au blanc d'œuf.

L'hydrolyse a été effectuée lentement en raison de la température basse (13° centigrade en moyenne) à laquelle les bouteilles furent maintenues.

Inoculation le 7 IX

Date	Cm³ de liquide recueillis pour :		
	α	G	γ
3 X	11 cc.	7 cc.	—
8 X	4 cc.	8 cc.	—
19 X	4.6 cc.	11.2 cc.	—
27 X	6 cc.	5 cc.	—
9 XI	—	1.2 cc.	1.7
Total 2 mois 2 jours	25.6 cc.	32.4 cc.	1.7

On remarque que les liquides fournis par α et G sont bien fluides, tandis que la petite quantité fournie par γ est visqueuse encore.

Il est intéressant de noter combien, par ce caractère de liquéfaction, la race G se rapporche de la race α.

Une seconde série a été effectuée, mais, cette fois-ci, en se servant du milieu de Raulin solidifié par la gélatine. La même technique a été employée. On remarque aussitôt que ce milieu est plus favorable à la liquéfaction que les précédents pour la race γ.

Cm³ de liquide récoltés dans les bouteilles des cultures :

Dates	α	α	G	G	γ	γ	V	V	W	W	N	N	B	B
16 XI	14.5	11.5	13.5	14	0	0	12	12	8.5	7.5	3	4.5	0	11.5
28 XI	3.7	6.3	4.6	3.8	6.5	3.5	5.6	5.6	7	8	10.5	10.8	18	6.5
Age : 1 mois et 1 semaine. Total.....	18.2	17.8	18.1	17.8	6.5	3.5	17.6	17.6	15.5	15.5	13.5	15.3	18	18

Ces chiffres donnés à la figure 38 permettent, avec les précédents, de conclure que la race α a un pouvoir liquéfiant marqué ; que la race G qui en dérive par sélection a le même pouvoir ; que toutes

les races issues de G ont une fonction analogue ; que la race γ a un pouvoir liquéfiant nettement moindre.

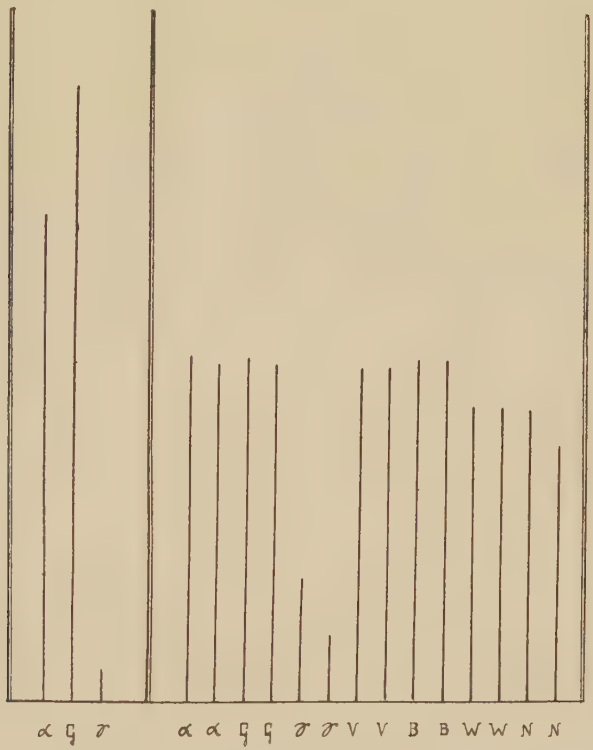


Fig. 38. — Comparaison du pouvoir liquéfiant de la gélatine des différentes races. A gauche, milieu de Coon ; à droite, milieu de Raulin.

§ 17. DESCRIPTION DES COLONIES OU SONT APPARUS DES SECTEURS

Des cultures à plusieurs zones distinctes (secteurs), ont été fournies par des races de *Phoma* non sélectionnées à partir d'un germe unique [1], par des races ayant subi cette purification et, par des races non retriées, mais dérivant par mutation de secteur de races plusieurs fois purifiées à partir de la spore unique. Nous

[1] Bien que la précaution soit exagérée, nous mettons, par scrupule généalogique, les cultures pures fournies par les stations centrales de cultures pures, dans cette catégorie.

décrirons les secteurs obtenus, dans l'ordre sus-mentionné, en raison de leurs significations différentes au point de vue génétique.

Figures sectoriennes.

Il y a lieu de signaler ici quelques notes prises à propos des figures dessinées par l'apparition de secteurs dans les colonies, et de les comparer à celles dues aux infections.

Suivant l'âge auquel la culture a formé le secteur, celui-ci aura son origine au centre, dans la partie moyenne ou dans la portion marginale de la colonie. Lorsque le secteur diverge parfaitement du centre vers la périphérie, il est légitime de soupçonner que les deux formes préexistaient dans la souche qui a servi à l'inoculation et que les deux végétations se sont développées concuramment ; il s'agit alors, ou d'un ensemencement double, ou bien, si le triage du tube d'origine ne fournit réellement qu'une race, d'un secteur précoce. Suivant l'angle d'ouverture, le secteur embrassera la moitié ou moins de la surface coloniale. La portion sectorienne peut aussi diverger comme un éventail, à partir d'un point défini, situé à 1 ou 2 cm. du centre ; il est alors aisé de savoir que l'on a affaire à une production nouvelle qui s'est réalisée au cours du développement de la colonie. Ces secteurs de la zone moyenne sont loin d'avoir toujours une forme régulière en coin ; leur zone de base peut tout aussi bien être une ligne (cas No 1) et donner lieu ainsi à une figure quadrilatérale.

Le secteur nettement marginal peut être interprété comme un effet de l'appauvrissement du milieu (« staling effect »). Il s'agirait d'une sorte d'auto-adaptation des portions marginales de la colonie à des conditions de nutrition différentes : diminution des ressources alimentaires, accumulation des produits du métabolisme, etc. Ce phénomène, qui est fréquent dans la technique mycologique, doit être pris en considération ; Brown[1] a fait à ce propos de judicieuses remarques.

Cependant, toutes les fois que nous avons eu l'occasion d'observer ces modifications de croissance sur les bords de la culture, elles apparaissaient comme une modification circulaire et à progression centripète, ce qui les distingue aisément des formes secteurs proprement dit, locales et centrifuges. Quant à la confusion d'un

[1] Brown W. l. c.

secteur original et d'une infection, elle n'est possible que si l'agent d'infection se trouvait être un *Phoma* lui-même ; or, nous n'avons jamais eu la moindre infection causée par l'une quelconque de nos races de *Phoma*. Celà se comprend aisément, en raison du mode de propagation des spores chez le genre *Phoma* ; elles ne sont jamais sèches et ne forment donc pas de poussières fertiles. Tout autre est la zone de contact entre un champignon quelconque et un *Phoma* ; leurs mycélium, loin de s'enchevêtrer, ne se côtoient même pas, en raison d'une zone franche de toute végétation qui sépare les deux organismes. Si même, on ensemence deux races voisines de *Phoma*, voir la même race, côte à côte, jamais on ne verra les croissances s'épouser aussi parfaitement qu'on le voit se faire entre la colonie normale et le secteur.

§. 18. CLASSE I. — COLONIES SECTORIENNES DÉVELOPPÉES A LA SUITE D'INOCULATIONS FAITES A PARTIR DE SOUCHES NON RETRIÉES PAR LA SPORE UNIQUE

Une culture du *Phoma alternariacearum*, isolée à partir d'une spore par Brooks et Searles, nous fut fournie sur malt-agar par Lister Institut de Londres. Après un passage sur milieu pomme de terre-agar, cette culture est repiquée, le troisième jour, sur un même milieu en vase Petri. Cette colonie est examinée le troisième jour, le cinquième jour, le dixième jour et présente une croissance régulière et une colonie homogène (50 mm. à dix jours). La végétation a débuté par un mycélium aérien blanc qui fut bientôt suivi par l'apparition de pycnides roses-rouges, constituant une zone plus ou moins glabre à croissance centrifuge. Le vingt-septième jour, on observe un secteur très franchement délimité entre deux rayons, dans la portion marginale de la colonie ; la partie la plus interne du secteur prend son origine à la périphérie de la zone fertile de la culture et son bord externe coïncide exactement avec celui du reste de la colonie, de telle façon qu'on en conclut à une vitesse de croissance parfaitement égale des deux zone mycéliennes.

Macroscopiquement, la portion sectorienne se distingue par un mycélium aérien fortement cotonneux ; le teinte foncée de cette végétation tranche sur le reste de la colonie. Les pycnides de la portion normale sont grandes, visqueuse et roses ; les pycnides

de la portion sectorienne sont plus petites, brunes, foncées et libèrent moins facilement des pycnospores. Ce secteur constitue donc la race γ, produite par mutation à partir du tissu mycélien normal appelé α (pour plus de détails anatomiques, voir la description des races paragraphes, 2 et 3).

Conditions : Cette mutation, qui est la plus franche que nous ayons notée, a été produite sur un milieu relativement pauvre en azote, milieu pomme de terre-agar. Elle s'est produite postérieurement à dix jours de culture. Il n'y a eu que deux générations (repiquages) entre cette culture et celle qui a dû séjourner plusieurs mois dans un même tube de culture à l'Institut Lister. Les deux repiquages, ayant été faits en tube, c'était la première fois que la colonie pouvait se développer en surface depuis un temps de culture prolongé, en tubes.

Dans le but de réaliser à nouveau l'apparence sectorienne que nous venons de décrire et qui a donc fourni γ, six vases de Petri furent inoculés sur milieu Coonagar par la même souche précédemment utilisée. Au bout de cinq jours, deux colonies déjà présentent une forme sectorienne, puis au huitième jour, une troisième montre l'apparence hétérogène. Les autres restent normales. La composition du milieu de Coon étant mieux balancée au point de vue du rapport azote-sucre, les différences entre les zones sectoriennes et la colonie normale s'accentueront moins que sur le milieu pomme de terre-agar.

La boîte sectorienne No 2 est couverte d'une colonie divisée en 5 secteurs de surfaces approximativement égales. Par analogie avec les végétations précédemment décrites nous leur donnons les noms de γ_1, séparé par une mince bande de mycélium stérile de γ_2 qui confine à α_1, qui confine à une zone stérile, qui confine à α_2, laquelle portion rejoint γ_1. α_1 et α_2 sont semblables de même que γ_1 et γ_2. La colonie âgée de trente-trois jours offre dans la zone α les caractères suivants :

La portion centrale du secteur est fertile en énormes pycnides brunâtres, libérant une masse de pycnospores ; la portion moyenne et périphérique des secteurs α est couverte d'un mycélium aérien continu et brunâtre.

La couleur foncée est due à la grande quantité des hypnocystes noires développées comme des nœuds allongés sur les cordons mycé-

liens ; beaucoup d'hypnocystes en forme de massues terminales sont attachées à des hyphes hyalines. Ces hypnocystes sont rarement attachées au hyphes du mycélium à articles courts ; elles pendent à l'extrêmité des hyphes à cellules allongées. Les zones γ sont caractérisées : par leur fertilité en pycnides jusqu'à dix fois plus petites que celles observées chez α ; ces pycnides sont brunes foncées et reliées les unes aux autres par des hyphes à articles courts ; un mycélium aérien constitué par des plages sporadiques de hyphes cotonneuses forme chez γ un gazon plus élevé, plus chevelu et moins foncé que celui de α ; l'examen microscopique révèle dans le mycélium une quantité de stades juvéniles d'hypnocystes non pigmentées, des chaînettes oïdium ou des masses glomeruleuses. On ne trouve pas les figures d'hypnocystes si abondantes en α.

La colonie sectorienne No 3 est divisée en trois zones : secteur α à grosses pycnides pâles, γ à petites pycnides foncées et, une zone stérile.

La colonie sectorienne No 4 est constituée d'une grande plage du type γ et d'un secteur de mycélium stérile.

Conditions :

Toutes ces colonies sectoriennes produites sur milieu Coonagar ont des secteurs précoces dont l'origine est au centre d'inoculation. La souche originale dont on est parti est cultivée depuis cinquante-cinq jours sur milieu pomme de terre-agar ; cette culture elle-même provenait d'une souche de l'Institut Lister.

Colonies sectoriennes No 5, 6 et 7.

Origine : Un tube de milieu de culture pomme de terre-agar, est inoculé à partir de la partie α de la boîte sectorienne initiale 1 ; ce tube, âgé de deux mois dix-sept jours sert de souche pour inoculer un milieu de culture Coonagar en vase de Petri où se développera la colonie sectorienne No 5. *Description* : Les secteurs, ainsi qu'on peut le voir sur la photographie de cete colonie (v. fig. 39 pl. IX) sont disposés dans l'ordre suivant : zone α_1, zone γ, zone stérile, zone α_2, zone stérile 2. Les secteurs α sont caractérisés par : une grande abondance de pycnides (v. fig. 40 pl. IX) ; cette portion n'a guère de mycélium aérien au début ; ce n'est qu'au bout de quelques

mois que le mycélium aérien se sera développé ; on y observe alors (v. fig. 41 pl. IX) beaucoup d'hypnocystes foncées et pour la plupart au niveau des pycnides d'où elles ont germé ; l'examen microscopique révèle encore des figures d'hypnocystes en chaînettes hyalines (v. fig. 42 pl. IX).

Les secteurs γ montrent au début un mycélium aérien blanc et court ; les pycnides y sont nombreuses et foncées ; on ne trouve aucune figure d'hypnocystes ; plus tard les hyphes terminales du mycélium aérien différencieront les chainettes d'oïdium une fois déjà décrite pour la race G. (v. paragraphe No 4 page 79). La fig. 43 pl. IX donne une idée de ces pseudo conidies hyalines suspendues dans le mycélium aérien.

Les portions stériles se sont couvertes d'un mycélium aérien où pullulent des hypnocystes noires bien formées (v. fig. 44 et 45 pl. IX). Dès le début les hyphes ont eu des cellules pigmentées.

Nous venons de voir que les tubes inoculés à partir du secteur initial α, et qui n'ont pas été soumis au triage par spores uniques, donnent des secteurs nouveaux ; le même phénomène se passe pour les souches directement prélevées du secteur initial γ et non soumises à la purification par le germe unique.

La colonie sectorienne No 6 (v. fig. 46 pl. X) en est la meilleure preuve. Un tube de milieu de culture pomme de terre-agar est inoculé à partir du secteur initial γ ; dix jours après on repique la culture sur un milieu Coonagar, où la culture séjourne sept mois sept jours; puis on inocule un milieu de Coonagar en vase Petri à partir de cette souche. La colonie sectorienne produite consiste en une zone étoilée centrale beaucoup plus foncée que le reste de la colonie du type pur γ. Les cellules ont un pigment intracellulaire que celles du type γ n'ont pas. La portion sectorienne centrale est accompagnée d'un mycélium aérien blanc laineux.

En inoculant à partir du même tube de culture, un milieu amidon-agar on obtient la colonie sectorienne No 7 fournie donc par la race γ. Les photographies de la fig. 47 pl. X montrent un échantillon particulièrement net de secteur originé au centre de la colonie; cette dernière consiste en une zone dominante de type γ.

De nombreuses pycnides, réduites il est vrai dans leurs dimensions, comme on l'a fait remarquer au paragraphe No 13, s'y voient ; par contre, la zone sectorienne en est dépourvue et fournit un mycélium aérien blanc, cotonneux, qui tranche nettement sur le

fond de la colonie à peine velue. Il s'agit ici d'une végétation γ qui a différencié rapidement une portion mycélienne stérile ; le mycélium interne de ce secteur est constitué par des articles à cellules pigmentées dès le début de la croissance ; il en sera de même pour la partie pure γ mais seulement plus tard.

Les conditions qui, pour les colonies sectoriennes Nos 6 et 7, déterminent la production de secteurs sont : 1. une commune souche de départ âgée de plus de sept mois sur milieu Coonagar ; cette culture était elle-même issue directement du secteur original γ sans triage ultérieur.

2. Des milieux différents, l'un pauvre en azote, l'autre de composition balancée. Les secteurs, tout en variant d'apparence sur chacun de ces deux milieux réalisent pourtant la même tendance : réduction de l'appareil pycnidial, élaboration intracellulaire de matières de réserve pigmentées et production de mycélium aérien.

§ 19. CLASSE II. — COLONIES SECTORIENNES No 8, FOURNIES PAR LES CULTURES DES RACES B ET N, NON TRIÉES A PARTIR D'UNE SPORE UNIQUE, MAIS DÉRIVÉES DE RACES PURES.

Une première colonie sectorienne est fournie par une culture de la race N sur milieu Coonagar dans lequel on a substitué du lactose au maltose. La colonie débute par une plage centrale incolore, constituée par un mycélium glabre, visqueux, stérile, du type B. Le reste de la colonie se partage en deux zones fertiles, l'une plus foncée que l'autre. La zone foncée a un réseau mycélien coloré en brun olive ; les cellules y sont pigmentées, tandis que le tissu de la portion plus claire a des hyphes à cellules hyalines. Les deux zones se distinguent aussi par un caractère qui a déjà été mentionné à propos de G ; la surface du secteur foncé est humide et le mycélium aérien y est détrempé ; la gelée d'agar est comme hydrolysée sous la mince pellicule de la surface coloniale ; il y a des sortes d'œdèmes qu'on peut crever en libérant une goutte d'eau. Il est difficile de rattacher la portion moins foncée à l'une quelconque des races sus-nommées ; on peut dire qu'il y a une forme amoindrie de N, moins capable de fournir des réserves pigmentées.

La même race N donne sur milieu Coonagar où le maltose a été remplacé par le galactose une *colonie sectorienne* avec des secteurs

du type stérile B. Inversément, une culture de B sur un milieu Coonagar où le maltose a été remplacé par du galactose, fournit un secteur fertile du type N. Ces types se distinguent aussi par le caractère hyalin de la végétation de B et le caractère pigmenté de celle de N.

En cultivant ces deux races B et N sur des milieux Coonagar où la teneur en azote varie de 100 à 0% [1], nous avons observé la production de nombreux secteurs.

Teneur en azote total :	*Race B*	*Race N*	Colonie :
0 %	H	S	H = homogène
3,12%	H	H	S = sectorienne
6,25%	H	H	
12,5 %	H	S	
25 %	H	S	
50 %	H	H	
75 %	S	H	
100 %	H	H	

De cette première expérience, on pourrait conclure que la quantité d'azote importe peu dans le phénomène de mutation chez la race B ; une colonie, en effet, a fourni un immense secteur du type N par sa fertilité en pycnides et sa couleur foncée du mycélium.

Pour la race N, l'instabilité semble s'augmenter à mesure que l'azote disparaît ; les secteurs fournis par N sont tous du type B.

Une deuxième série de cultures de la race B, sur des milieux où l'azote diminue, donne plus de crédit à l'observation faite à propos de la race N. On voit, en effet, sur la figure No 27 pl. V., qu'il y a production croissante de secteurs au fur et à mesure que la disponibilité en azote diminue :

% d'azote :	100	75	50	33	25	12,5	6,25	0
Culture :	H	H	H	S	S	S	S	H

H = homogène, S = sectorien.

Les secteurs sont du type fertile à hyphes non hyalines ; la photographie correspond au vingt-troisième jour de culture.

[1] Voir page 101 le % en valeur absolue.

Les conditions dans lesquelles ces différents secteurs ont été obtenus sont :

Des milieux différents, des souches de départ jeunes encore ; il n'est donc pas ici question d'une culture altérée par l'âge. Quant à l'importance du milieu, elle paraît secondaire ; seule, l'absence d'azote favorise la production de secteurs du type foncé, riches en matières de réserve hydrocarbonée. La mutabilité paraît être due au fait que les races B et N dérivent récemment de secteurs de la demi-race G ; cette mutabilité demeurera d'ailleurs comme un caractère de B et N, comme elle le fut de V et W. Les secteurs que nous venons de décrire, ont été groupés sous le même chiffre, secteurs No 8.

§. 20. CLASSE III. — SECTEURS FOURNIS PAR DES CULTURES DE RACES SÉLECTIONNÉES A PARTIR DE GERMES UNIQUES.

Colonie sectorienne No 9.

La race G, triée par sélection à partir de la spore unique du sein d'une population α, fut repiquée sur milieu de Czapeckagar, puis une seconde fois, et de cette culture on ensemença toute une série de milieux de culture Coonagar, variant par la teneur en azote de 100 à 0 %. Ce n'est que sur ce dernier milieu, dépourvu d'asparagine, que la colonie de G développa l'apparence sectorienne suivante : au centre, un mycélium incolore stérile à hyphes hyalines, glabre et de consistance visqueuse ; puis, soudainement, à des distances différentes du centre de la colonie, se différencient des hyphes pigmentées et munies de pycnides, d'où résulte pour le disque colonial une apparence d'étoile blanche au milieu d'une culture foncée.

La portion centrale incolore est une végétation anormale de G, à laquelle on a donné le nom de V ; la portion marginale pigmentée fut appelée W (pour plus de détails sur la structure morphologique de ces deux races, voir le paragraphe No 5).

Les conditions dans lesquelles la race G a développé ces secteurs furent : une souche de départ jeune et un milieu dépourvu d'azote aminé.

La première végétation anormale se caractérise par la stérilité

et l'absence de pigments intracellulaires. Puis, par une brusque transformation, l'organisme différencie un tissu où les pycnides abondent et les matières de réserve chromogènes aussi.

Secteurs fournis par les races V et W dans les Colonies sectoriennes No 10.

Au cours d'une culture sur milieu Coonagar, où l'on a substitué au maltose du lévulose, la race V issue de souches sélectionnées à partir d'une spore unique, a fourni un petit mais très net secteur marginal. Au cinquième jour, au douzième jour du développement, rien n'était encore visible ; au bout d'un mois, la colonie couverte d'un mycélium aérien constitué par des hyphes hyalines et fournie de pycnides sporadiquement distribuées, présente une zone marginale plus foncée, en forme d'éventail ; ce secteur noir, de surface absolument plate, glabre, stérile, tranche nettement avec le reste de la surface coloniale, gazonée, pustuleuse, blanchâtre. L'examen révèle que les hyphes du secteur sont constituées par l'alternance de cellules pigmentées et de cellules hyalines ; le reste du mycélium est presque exclusivement constitué d'éléments hyalins.

Le secteur est donné ici sur un milieu de composition balancée par une souche V, issue elle-même d'une colonie inoculée par une seule spore. Ni l'âge des parents, ni les conditions défavorables de la culture n'expliquent la production du secteur qu'il faut attribuer à l'instabilité de la race V.

Cette instabilité particulière aux race G, W et V (cette dernière étant encore la mieux fixée), se manifeste visiblement dans les cultures faites sur milieu pain. Je réunirai sous la rubrique : colonies sectoriennes No 10, ces différents aspects hétérogènes.

Nous avons signalé au paragraphe No 13 que la race G, cultivée sur milieu pain, donnait une quantité de secteurs distribués en îlots épars sur la colonie, qui contracte alors l'aspect d'une mosaïque ; chaque plage est constituée par une touffe de gazon mycélien du type stérile V.

Les colonies de la race W à tant d'égards si proche de G, ont fourni des figures identiques.

La race V se révèle plus stable et produit une colonie homogène consistant en un gazon à hyphes aglycogéniques ; la fixité relative de V est d'ailleurs conforme aux observations biométriques faites à propos de ses pycnospores (voir paragraphe No 15).

Sur le milieu moût-agar neutre, seule l'irrégularité de la couleur coloniale est à noter pour la race G. La race W fournit deux régions sectoriennes de faible importance. La race V donne, au contraire, au milieu d'une colonie glabre un fort secteur de mycélium aérien blanc ; plus tard, ces plages de gazon seront plus nombreuses, quoique toujours irrégulièrement distribuées.

Sur moût-agar acide, les colonies de G sont demeurées complètement homogènes pour plus d'un mois. Quant à V et W, ils développent, sur moût-agar acide jusqu'au dixième jour, des colonies distinctes, mais demeurées hyalines et stériles.

Puis au quinzième jour, W par un secteur croissant, foncé et gazoné, développe une demi-circonférence sectorienne ; cette zone s'augmente jusqu'à couvrir la boîte ; au vingt-troisième jour, tout aspect sectorien a disparu pour faire place à une apparence homogène d'épais gazon mycélien vert. Deux échantillons de W se comportent de même.

Ce secteur croissant de W tranchait nettement par son gazon vert sur la colonie incolore et glabre d'où il naquit. Les deux échantillons de la colonie de V sur moût-agar acide demeurent identiques jusqu'au quinzième jour. A partir de cet âge, l'une des colonies différencie un secteur foncé qui contraste vivement avec le reste de la culture ; ce secteur aigu, atteint la demi circonférence, puis finit par envahir la totalité de la culture ; la portion noire consiste en l'agglomération de pycnides réduites, termes de transition avec les hypnocystes. Il ne s'agit, bien entendu pas d'une végétation qui se superpose à celle déjà existant, mais d'une modification physiologique qui progresse suivant une répartition sectorienne. La colonie se ride et produit un gazon blanc crépu sur une partie du disque noir. Il est intéressant de noter que bien que le retour à la fertilité rapproche cette forme fertile V de W, on n'arrive cependant pas du tout à la même apparence coloniale. Pendant qu'un échantillon de V s'est ainsi modifié, l'autre, placé dans des conditions apparemment identiques, demeure incolore et stérile. On voit sur la fig. 49 pl. XI les deux colonies de la race V, l'une mutée, l'autre normale et photographiées toutes deux à l'âge de trente-trois jours.

Les conditions dans lesquelles apparurent les secteurs furent : des souches pures de V et W sur milieux très pauvres en azote ; la plupart des secteurs furent des zones où le *Phoma* réalise un système mycélien riche en réserves pigmentées.

Colonie sectorienne No 11.

Un secteur très foncé apparut dans une culture de la race γ sur milieu Coonagar où le maltose avait été remplacé par du saccharose. La fig. 48 pl. X montre une zone foncée au milieu d'une colonie γ caractérisée comme d'habitude par un mycélium interpycnidial hyalin ; la portion foncée est constituée par la pigmentation des hyphes, le nombre des articles plus élevé et des pycnides plus noires.

Ce fut le premier cas de mutation sectorienne chez γ depuis son triage. Les conditions où se produisit cette modification brusque sont : un milieu riche en sucre et en azote ; la souche de départ n'est pas particulièrement âgée ; la colonie avait dix-sept jours d'âge quand elle fut photographiée. Seule la nature du sucre est un élément nouveau pour cet organisme. Certains indices nous firent alors croire que, si bien triée qu'elle soit, une souche qui a séjourné longtemps, quelques mois au moins, sur un même milieu de culture, a la faculté de produire des secteurs quand on la repique sur un milieu frais.

Pour vérifier cette supposition, nous avons employé des tubes de culture de la race α et de la race γ, assez âgés : nous savions que ces tubes n'avaient été ouverts qu'une seule fois et qu'ils descendaient eux-mêmes de cultures faites à partir d'une cellule unique.

On inocule sur milieu Coonagar 2 vases Petri avec une souche de la race α âgée de plus de cinq mois, issue elle-même d'une culture née d'un seul germe ; le second vase Petri est ensemencé à partir d'une souche α un peu plus âgée encore et issue elle-même directement d'une autre culture monosporée.

On voit la culture se développer parfaitement homogène, jusqu'au quinzième jour où elle est photographiée (v. fig. 50 pl. XII) et demeurer telle ensuite. La même double culture est refaite mais cette fois-ci sur des milieux Coonagar où l'on a substitué au maltose une fois du galactose et l'autre fois du saccharose. Là encore, on observe la croissance de colonies parfaitement homogènes; l'apparence générale diffère un peu suivant chacun des trois sucres employés, mais aucun secteur ne se forme.

On en conclut que même après un séjour prolongé de plus de cinq mois, la race pure α ne s'est pas altérée et ne fournit aucune zone sectorienne, si même on passe brusquement d'un sucre à l'autre.

Colonies sectoriennes Nos 12. 13 et 14.

Il n'en est pas de même avec la race γ pour laquelle une expérience analogue fut faite.

Deux milieux Coonagar en vase Petri sont inoculés, l'un par un tube de culture γ sur Coonagar âgé de cinq mois environ et issu lui-même d'une culture monosporée, et l'autre par un tube de culture γ du même âge et également issu d'une autre culture monosporée γ. Des deux colonies qui résultent de cette inoculation, l'une est homogène et l'autre (12) fournit un secteur marginal (voir fig. 51 b pl. 13). Le secteur dont il est question est plus foncé que le reste de la colonie ; le mycélium y est uni, stérile, et consiste en hyphes à articles allongés et pigmentés ; il n'y a aucune pycnide. Le reste de la colonie est formé d'un réseau mycélien interpycnidial hyalin qui réunit les nombreuses pycnides. A véritablement parler le secteur est originé au centre de la colonie. Chez cette dernière, aussi bien que chez celle demeurée homogène, on observe les phénomènes d'arrêt de croissance sur la marge coloniale devenue plus foncée (staling effect). Le passage a été fait pour les deux du milieu Coonagar maltose sur Coonagar maltose. Beaucoup plus décisive est la réaction de l'organisme quand on le transplante d'un milieu Coonagar maltose, où il a longtemps séjourné, sur un milieu Coonagar saccharose ou Coonagar galactose.

La fig. 51 c pl. 13 montre une colonie sectorienne sur Coonagar saccharose. La souche qui a servi à l'inoculation est l'une des deux cultures âgées de cinq mois (13). Le disque colonial est partagé en deux hémicycles, l'un tout à fait foncé, l'autre du type ordinaire, c'est-à-dire à espaces interpycnidiaux hyalins. La portion sectorienne pigmentée est couverte d'un mycélium aérien opaque, consistant en hyphes brunes ; cette partie est très pauvre en pycnides par opposition à la surface normale glabre et fertile de γ. La même souche sur Coonagar maltose n'avait fourni aucun secteur.

L'autre souche γ, âgée de cinq mois environ, donne sur milieu Coonagar galactose un secteur très évident (14). La moitié de la colonie est occupée par un mycélium stérile en croissance tourbillonnaire ; cette zone stérile est recouverte d'un gazon mycélien blanc ; la zone stérile a des hyphes à articles hyalins ; quant à la portion dite normale, elle est glabre, fertile et diffère de la végétation

γ ordinaire par la nature pigmentée de ses cellules ; une couleur foncée en résulte. V. fig. 51 d pl. 13. La même souche, développée sur Coonagar maltose avait fourni un léger secteur.

Les conditions dans lesquelles se sont produits les trois derniers secteurs sont :

Des souches de départ très âgées sur milieu Coonagar ; des milieux de composition balancée. On a pu remarquer que, transporté sur un même sucre, l'organisme vieilli n'a pas fourni de secteur, ou alors une ébauche de lecteur. Tandis que, replanté sur un milieu nouveau par la nature du sucre, le champignon a manifesté un affolement notoire.

Sélection de la race b.

Ces résultats étant acquis pour la race γ, il devenait intéressant de déterminer si les secteurs apparus étaient de formation postérieure à l'inoculation sur le nouveau milieu de culture ou si les formes mutées préexistaient dans le tube de culture où elles se seraient différenciées au cours du temps. Dans le but de vérifier la seconde de ces hypothèses, nous avons sélectionné des spores du tube γ, âgé ; dans le cas où la mutation préexiste dans ce tube, nous pouvions par chance, isoler à l'état pur la forme parente et la forme mutante, ce qui se réalisa d'ailleurs.

Nous avons pris la précaution d'employer le même sucre (dans une série galactose, dans une seconde mannose) pour la sélection et la culture, afin d'éviter tout passage brusque d'un sucre à l'autre. Nous sommes partis d'un tube de *Phoma* dit γ_N issu d'une spore unique et vieux de six mois, vingt-trois jours (du 2. V au 25. XI). Une sélection fut faite en milieu Coonagar-galactose, l'autre Coonagar-mannose. Chaque boîte a été ensemencée par une seule spore. Coonagar-galactose : au bout de cinq jours il est difficile de décider d'une différence nette, bien que des nuances roses et noires, se manifestent ; au bout de sept jours, sur 7 vases Petri, 6 présentent des colonies identiques montrant un mycélium aérien net, blanc ; la colonie est ponctuée tout autour de pycnides fermes, noires ; une boîte, d'un type γ sans mycélium aérien, fournit par contre des pycnides roses brunâtres abondantes. Si l'on examine de plus près le type des six premières boîtes (n = noir ou γ proprement dit), on trouve les pycnides foncées suspendues comme des boules dans le mycélium aérien parfaitement gris-blanc ; les pycnides sont sou-

vent agglomérées en paquets ; la boîte appelée b (blonde) ne montre aucun mycélium aérien et des pycnides à demi enfoncées dans le milieu agar, isolées.

Sur Coonagar-mannose, la sélection de six cellules uniques fournit six cultures, dont trois du type γ pur, glabres, munies de pycnides noires ; trois autres sont constituées par un type γ, mais à pycnides roses ; l'examen montre qu'au bout de six jours le type n (noir) est constitué par un mycélium très lâche, constitué d'hyphes hyalines qui portent dans leur réseau des pycnides aériennes noires foncées, dépourvues d'ostioles et couvertes de duvet hyalin constitué par des hyphes de germination ; le quinzième jour, le mycélium aérien s'est accentué et porte une grande quantité d'hypnocystes dérivant en chapelets, principalement des pycnides ; l'apparence générale de la culture est noire, à cause des hyphes colorées, des hypnocystes et des pycnides.

Les trois autres colonies du type b ne montrent aucun mycélium aérien au bout de six jours, mais de nombreuses pycnides roses à demi-enfoncées dans le milieu. Au bout de quinze jours, toujours pas de mycélium aérien ; b montre une concentration plus élevée en pycnides que γ ; la couleur générale de la colonie est pâle-brune sans être transparente. Les différences sont plus marquées encore que sur Coonagar-galactose.

Sur Coonagar à base de nitrate d'ammonium, n est brun violacé, tandis que b est brique.

Les précédentes observations montrent suffisamment que la race γ a fourni une forme mutée b qui tend, par la couleur et la disposition des pycnides, à réaliser une végétation qui se rapproche de celle de α.

La race b a été produite à nouveau, mais cette fois-ci non plus par sélection, mais par secteur direct de γ dans les circonstances suivantes :

Un milieu moût-agar acide, en vase de Petri, est inoculé par une souche γ qui a séjourné un peu plus d'un mois sur milieu Coonagar ; cette souche est elle-même issue d'une race purifiée à partir d'une seule spore.

La colonie de γ, sur moût-agar acide devient rapidement sectorienne et se divise en trois zones. Une portion fertile a le type habituel γ, c'est-à-dire des pycnides foncées plus ou moins externes au milieu et couvertes d'un léger mycélium aérien. Une seconde

portion fertile correspond tout à fait à la description b : pycnides brunes à roses à demi enfoncées dans le milieu, absolument glabres.

La troisième zone consiste en un mycélium stérile blanc, accompagné d'un gazon blanc et verdâtre au centre. Les conditions dans lesquelles le mutant b apparaît sont : le défaut de nourriture azotée sur milieu moût-agar ; d'autre part, la souche dont on est parti n'était pas très âgée.

Des cultures faites sur moût-agar des races n et b, précédemment triées par sélection, montrèrent que n'était un pur γ, et que b se rapprochait très nettement de la culture d'α sur le même milieu.

Conclusions

Mutations

1. — Une colonie type de l'*Aspergillus ochraceus* Wilh. (α) a fourni un secteur très franc, dont le type de végétation fut appelé γ. Des différences dans la hauteur et l'épaisseur des conidiophores, la structure du bouquet conidial, la faculté d'assimiler l'azote, distinguent les deux races. La race α et la race γ, furent sélectionnées à nouveau, et celà plus d'une fois, à partir de cellules-germes. Cependant, en dépit de ces triages et passages sur les milieux les plus variés, les caractères distinctifs ont persisté au travers de plus de 40 générations, représentant une année de culture continue. La race γ a régulièrement fourni par mutation, dans des conditions définies, la race α. L'inverse n'a pu être expérimentalement réalisé.

2. — La culture du *Phoma alternariacearum* Brooks et Searles, a fourni 5 races, toutes issues par mutation conidienne de la souche originelle, appelée α. Ces races nommées par convention, α, b, W, G. V, γ, se distinguent les unes des autres par de petites différences, dont la nature et la constance sont de l'ordre signalé à propos de l'*Aspergillus*.

Nous avons ordonné ces races suivant la ressemblance qu'elles présentent entre elles, du type α au type γ, en passant par les types intermédiaires : b, W, G et V (fig. 52).

La première constatation à faire, est, que les types extrêmes α et γ, présentent une stabilité beaucoup plus grande que les types intermédiaires, G, en particulier, auquel on serait tenté de donner le nom de demi-race, suivant le sens de De Vries.

Manifestation de la mutation.

Chez l'*Aspergillus ochraceus*, la mutation se manifeste par l'apparition d'îlots d'une végétation différente, sporadiquement distribués dans l'aire coloniale ; ces zones apparaissent tardivement dans des cultures âgées, et n'ont plus la place, ni les ressources

peut-être, d'étendre leurs végétations, d'où résulte l'absence de véritables secteurs.

Chez les *Phoma*, des mutations de hyphes, peuvent avoir lieu dès le début du développement colonial et déterminent alors des figures qui donnent au disque colonial une apparence hétérogène, dite sectorienne.

Sens de la mutation.

Chez *Aspergillus ochraceus* la mutation est celle d'une forme imparfaite γ, qui retourne au type parfait d'où elle est dérivée ; ce retour est complet, absolu ; la mutation est progressive, car l'on passe d'une race peu fertile et, exigeante quant à ses besoins de nourriture, à une race beaucoup plus fertile et plus sobre.

Pour les *Phoma* les mutations ont eu lieu dans les deux sens ; cependant aucun des cas observés n'a montré un retour intégral chaque mutation produit une forme qui s'approche, mais qui ne s'identifie pas avec une forme déjà connue.

Caractères mutants.

Chez l'*Aspergillus ochraceus*, la mutation affecte un ensemble de caractères qui paraissent liés entre eux : faculté d'assimiler l'azote, structure de l'appareil conidial et abondance des spores, production intracellulaire d'un pigment. Le diamètre des spores n'est pas affecté.

Chez le *Phoma*, la mutation affecte aussi un ensemble de caractères qui sont liés : faculté d'assimiler les hydrates de carbone, production intracellulaire de glycogène accompagné d'un pigment foncé, production d'un régime mycélien riche en éléments hypnocystes. La valeur statistique de longueur des pycnospores est parfois modifiée par les mutations.

Signification physiologique de la mutation.

Sans pouvoir donner de règle certaine, signalons, que la mutation n'est pas sans relations avec les conditions du milieu où elle apparaît.

Pour l'*Aspergillus*, nous avons obtenu une forme mutée plus vigoureuse, plus adéquate à réaliser une végétation et une fertilité maximale sur les milieux appauvris.

Pour les *Phoma* la mutation consiste, le plus souvent, dans l'acquisition de la faculté de disposer plus facilement des sources d'hydrates de carbone offertes à l'organisme. Des cas de perte de cette faculté se sont néanmoins réalisés.

Causes de la mutation.

Les considérants qui précèdent ne signifient pas, que nous attribuons aux conditions du milieu de culture, un caractère de causalité dans la mutation. Nous croyons plutôt, qu'il faut considérer ce milieu, comme un détecteur qui rend visible une altération préexistante. Présence ou absence de sucre, d'azote, ne sont que des obstacles où s'éprouve la santé génétique des organismes étudiés. Il y a peut-être lieu de faire intervenir ici les notions émises par De Vries[1] concernant la *prémutation*, modification invisible de l'idioplasme, modification qui peut précéder dans le temps, la *mutation* proprement dite, ou manifestée.

Inefficacité de la sélection dans les lignées pures.

Johannsen montrait en 1903 que, dans les lignées pures, la sélection n'a pas d'effet durable ; les fluctuations de la descendance des individus extrêmes ont les mêmes limites et les mêmes maxima que les fluctuations des descendants des individus moyens. Jennings[2] a plus tard montré l'impuissance de la sélection au sein de lignées pures de *Paramecium caudatum* à créer des races nouvelles.

La Rue [3] a spécialement étudié la question de sélection chez le champignon *Pestalozzia Guepini*, et conclut comme Johannsen et Jennings.

Cette notion, s'est pleinement vérifiée dans nos études ; la race γ du Phoma fut à ce propos soumise à une enquête qui montra une fois de plus, l'inefficacité de la sélection, pour ce qui est des caractères considérés, au sein des lignées pures.

Espèces convergentes et phylogénie.

De l'étude du *Phoma*, peut se tirer une dernière conclusion qui touche au problème fondamental de la notion et l'origine de l'espèce.

[1] Vries, de, Hugo : « Mutationen und Praemutationen ». Naturwissenschaften 12 (1924), p. 253-260.
[2] Jennings, H. S.: Life and Death. Heredity and Evolution in Unicellular organisms.» (1920), Boston, Richard, G. Badger.
[3] La Rue, C. D. : « Selection within pure line of Pestalozzia ». Genetics 7 (1922).

La nature offre, dans tous les groupes végétaux, des séries de petites espèces auxquelles on n'a attaché l'importance qu'elles méritent, que depuis l'œuvre clairvoyante de Jordan.

Chez les microorganismes plus encore que chez les plantes supérieures, cette notion s'impose et rend moins définissable le terme espèce. A titre d'exemple, je ne signale ici que les études de Thom et Church [1] sur les *Aspergillus* du groupe *A. flavus*, *A. orizae*, *A. Wentii* ; toutes les formes intermédiaires ont été réunies. Kita

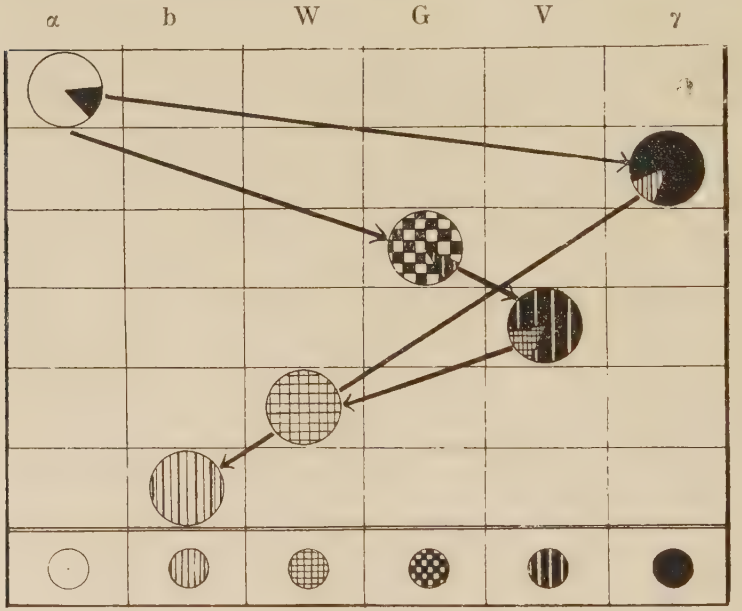


Fig. 52. — Schéma généalogique montrant la filiation des cinq races de *Phoma*, issues par mutation conidienne de la race originelle α.

(pour Kita v. p. 65) lui-même dans le groupe de l'A. ochraceus a renoncé à décrire les formes qu'il observe. R. Chodat, d'autre part signale pour le genre Scenedesmus l'existence de séries parfaitement continues.

Gates, en parlant des nombreuses races de Drosophiles dit :

« Quand toutes ces couleurs d'yeux de drosophiles sont ordonnées, elles représentent une série si serrée, que pour la plupart des naturalistes il y aurait une continuité, même sous le microscope ;

[1] Thom, Ch., and Church, M. B. : *Aspergillus flavus*, *A. orizae*, and associated species. Americ. Journ. Botany. Vol. VIII, No 2 (1921), p. 103-126.

et, des experts même pourraient difficilement catégoriser tous les individus appartenant à cette série ». On pourrait citer bien d'autres cas où la nature montre un aspect de continuité parfaite. Nous avons, dans le schéma de filiation exprimé par la fig. No 52, ordonné nos races de *Phoma* suivant la ressemblance qu'elles présentent entr'elles du type α au type γ, en passant par les types intermédiaires : b, W, G et V. Cet ordre, est celui que les systématiciens adoptent en face d'un matériel biologique à classifier : passer, d'un type extrême à l'autre selon l'ordre de plus grande ressemblance. Le phylogéniste, qui croit volontiers que l'état actuel de la nature est une projection directe de son passé, formule alors, sur la base de la classification systématique, l'hypothèse vraisemblable que le passage d'un extrême à l'autre s'est fait par des mutations minimes, qui ont réalisé successivement les termes de transition qu'il constate dans la série.

Or, il est intéressant de voir qu'ici, où nous connaissons l'ascendance, les phénomènes de plus grande ressemblance n'impliquent pas nécessairement ceux de plus proche parenté, et, que le groupement systématique des petites espèces, est plus l'expression d'un phénomène de convergence que celle de la réalité phylogénétique. On remarque, en effet, sur l'arbre généalogique simplifié, que la filiation ne va pas de α en b, de b en W, mais procède bien par des sauts brusques, puis des retours qui évoquent la notion d'oscillations.

EXPLICATIONS DES FIGURES

Fig. 1. (planche I). — Secteur γ apparu dans une colonie d'*A. ochraceus* α. A gauche, lumière rasante, mycélium aérien visible, à droite, mycélium vu par lumière transparente.

Fig. 2. — Appareil conidial de l'*A. ochraceus* α à gauche ; γ à droite.

Fig. 3. — Stérigmates de l'*A. ochraceus* α à gauche ; γ à droite.

Fig. 4. — Courbes exprimant les vitesses de croissance en diamètre des races α et γ de l'*A. ochraceus*, sur milieu Coonagar où la teneur normale en maltose varie suivant le % indiqué.

Fig. 5. — Courbes exprimant les vitesses de croissance des races α et γ de l'*A. ochraceus*, sur milieu Coonagar où la teneur normale en asparagine varie suivant le % indiqué.

Fig. 6. — *A. ochraceus* sur milieu liquide de Raulin. A gauche, γ ; à droite α. Age : 13 jours. (Pl. II).

Fig. 7. — *A. ochraceus* sur milieu liquide de Raulin. En haut, à gauche γ, qui fournit par mutation α_M en bas, à gauche. A droite α qui reste constant. (Pl. II).

Fig. 8. — Schéma généalogique des 5 races issues par mutation de la souche α du *P. alternariacearum*. Les triangles munis d'un point représentent des triages à partir d'une spore unique. L'alternance des figures de tubes et vases Pétri signifie une culture fréquemment repiquée, une ligne droite signifie une culture prolongée sur le même milieu.

Fig. 9. — Hyphes et hypnocystes muriformes. Culture du *P. alternariacearum* âgée de 22 jours.

Fig. 10. — Même colonie qu'à la fig. 9 ; hypnocystes en massues.

Fig. 11. — Ebauches d'hypnocystes dans une culture de *P. alternariacearum* α.

Fig. 12. — Germinations de pycnospores du *P. alternariacearum* α.

Fig. 13. — Hyphes du *P. alternariacearum* γ.

Fig. 14. — Hyphes du *P. alternariacearum* γ.

Fig. 15. — Hypnocystes du *P. alternariacearum* γ.

Fig. 16. — Ramifications des hyphes périphériques, en haut type α simple, en bas γ tourmenté.

Fig. 17. — Hyphes du *P. alternariacearum* W, ramification simple, éléments pigmentés.

Fig. 18. — Hyphes du *P. alternariacearum* V, ramification tourmentée, éléments hyalins.

Fig. 19. — En haut : ramification de la race W. En bas : ramification de la race V. Photographié sur les cultures. (Pl. III).

Fig. 20. — Comparaison des croissances en diamètre des races α G γ, sur des milieux Coonagar où la teneur normale en maltose varie suivant le % indiqué.

Fig. 21. — Colonie de *P. alternariacearum.* V à gauche, W à droite sur milieu Coonagar à base de Saccharose. (Pl. IV).

Fig. 22. — Comparaison des croissances en diamètre des races α G γ, sur des milieux Coonagar où la teneur normale en asparagine varie suivant le % indiqué.

Fig. 23. — Croissance comparée des trois races sur milieu Coonagar. Cultures d'un mois. (Pl. IV).

Fig. 24. — Race γ du *P. alternariacearum* sur milieu Coonagar dont la teneur normale en asparagine varie de gauche à droite : 0, 3, 6, 12, 25, 50, 75, 100%. (Pl. V).

Fig. 25. — Race W, milieu idem. L'asparagine varie de gauche à droite de : 0, 3, 6, 12, 25, 50, 75, 100%. (Pl. V).

Fig. 26. — Race V, milieu idem. L'asparagine varie de gauche à droite de : 0, 3, 6, 12, 25, 50, 75, 100%. (Pl. V).

Fig. 27. — Souche B, milieu idem. L'asparagine varie de gauche à droite de : 0, 3, 6, 12, 25, 50, 75, 100%. (Pl. V).

Fig. 28. — Race γ sur milieu Coonagar dont la teneur normale en asparagine varie de gauche à droite de : 0, 3, 6, 12, 25, 50,, 75, 100%. (Pl. V microphotographie).

Fig. 29. — Photographies des hypnocystes apparues sur des milieux Coonagar sans asparagine, pour les races α, G, γ. (Pl. VI).

Fig. 30. — A gauche, race α, à droite race γ sur milieu Coonagar. (Pl. VII).

Fig. 31. — Comparaison des pycnides de la race α, haut gauche, et de la race γ, haut droite (Coonagar). En bas, les mêmes sur milieu amidon-agar. (Pl. VII).

Fig. 32. — Croissance des races α, G, γ sur des rondelles de pomme de terre. (Pl. VI).

Fig. 33. — Milieu pomme de terre. (Pl. VIII).

Fig. 34. — Milieu de pomme de terre. (Pl. VIII).

Fig. 35. — Milieu pain. (Pl. VIII).

Fig. 36. — A gauche race V, à droite race W sur moût-agar neutre. (Pl. XI).

Fig. 37. — Courbes exprimant les valeurs statistiques de longueur des pycnospores chez les différentes races.

Fig. 38. — Comparaison du pouvoir liquéfiant de la gélatine des différentes races. A gauche, milieu de Coon, à droite, milieu de Raulin.

Fig. 39. — Boîte sectorienne No 5. (Pl. IX).

Fig. 40. — Zone α. Hypnocystes et pycnides. (Pl. IX).

Fig. 41. — Zone α. Hypnocystes. (Pl. IX).

Fig. 42. — Zone α. Strepto-hypnocystes. (Pl. IX).

Fig. 43. — Zone γ. Pycnides. (Pl. IX).

Fig. 44. — Zone stérile. Hypnocystes. (Pl. IX).

Fig. 45. — Zone stérile. Hypnocystes. (Pl. IX).

Fig. 46. — Boîte sectorienne No 6. Race γ sur Coonagar. (Pl. X).

Fig. 47. — Boîte sectorienne No 7. Race γ sur milieu amidon-agar. A gauche lumière transparente, à droite lumière rasante. (Pl. X).

Fig. 48. Boîte sectorienne No 11. Race γ sur Coonagar-saccharose. (Pl. X).

Fig. 49. — Race V sur moût-agar acide. Même souche de départ. A gauche forme mutée, à droite forme normale. (Pl. XI).

Fig. 50 — Cultures en haut à gauche de α sur Coonagar-maltose, à droite idem, mais d'une autre souche α. — En bas, à gauche α sur Coonagar-galactose, à droite α sur Coonagar-saccharose. (Pl. XII).

Fig. 51. — Cultures en haut à gauche du *P. alternariacearum* γ sur Coonagar-maltose, à droite idem, mais d'une autre souche (secteur No 12). — En bas à gauche race γ sur Coonagar-saccharose (boîte sectorienne No 13), à droite race γ sur milieu Coonagar-galactose. (Pl. XIII).

Fig. 52. — Schéma généalogique montrant la filiation des 5 races issues par mutation conidienne de la race originelle α.

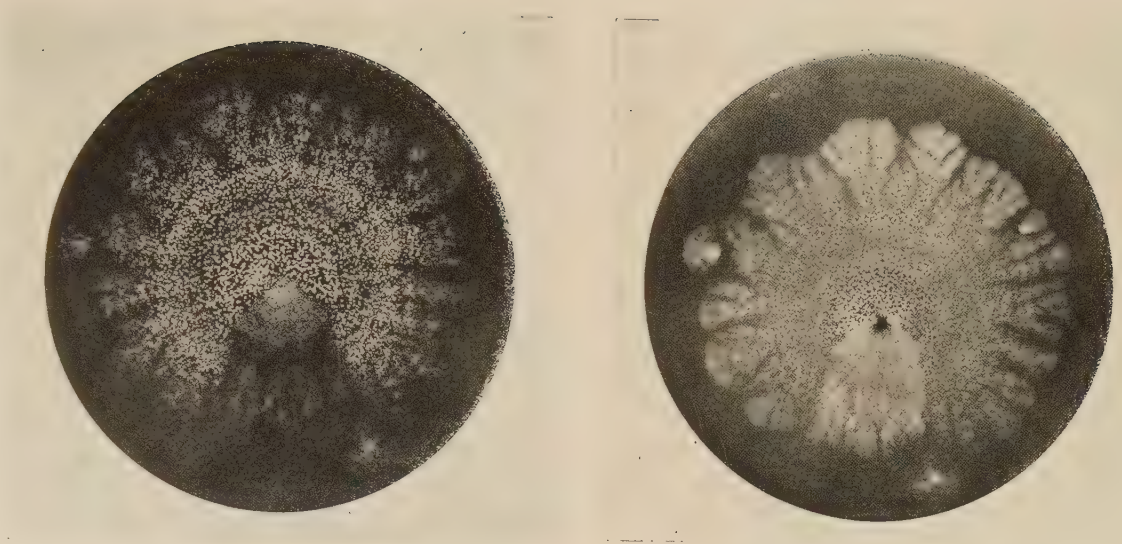


Fig. 1. — (planche I) Secteur γ apparu dans une colonie d'*A. ochraceus* α. — A ~~droite~~, gauche lumière rasante, mycélium aérien visible, à ~~gauche~~, mycélium interne vu par transparence.

Fig. 6. — *A. ochraceus* sur milieu liquide de Raulin ; à gauche, race γ, à droite race α. Age : 13 jours.

Fig. 7. — *A. ochraceus*, sur milieu liquide de Raulin. En haut, à gauche, γ qui fournit par mutation α_M ; en bas, à gauche. A droite α qui reste constant.

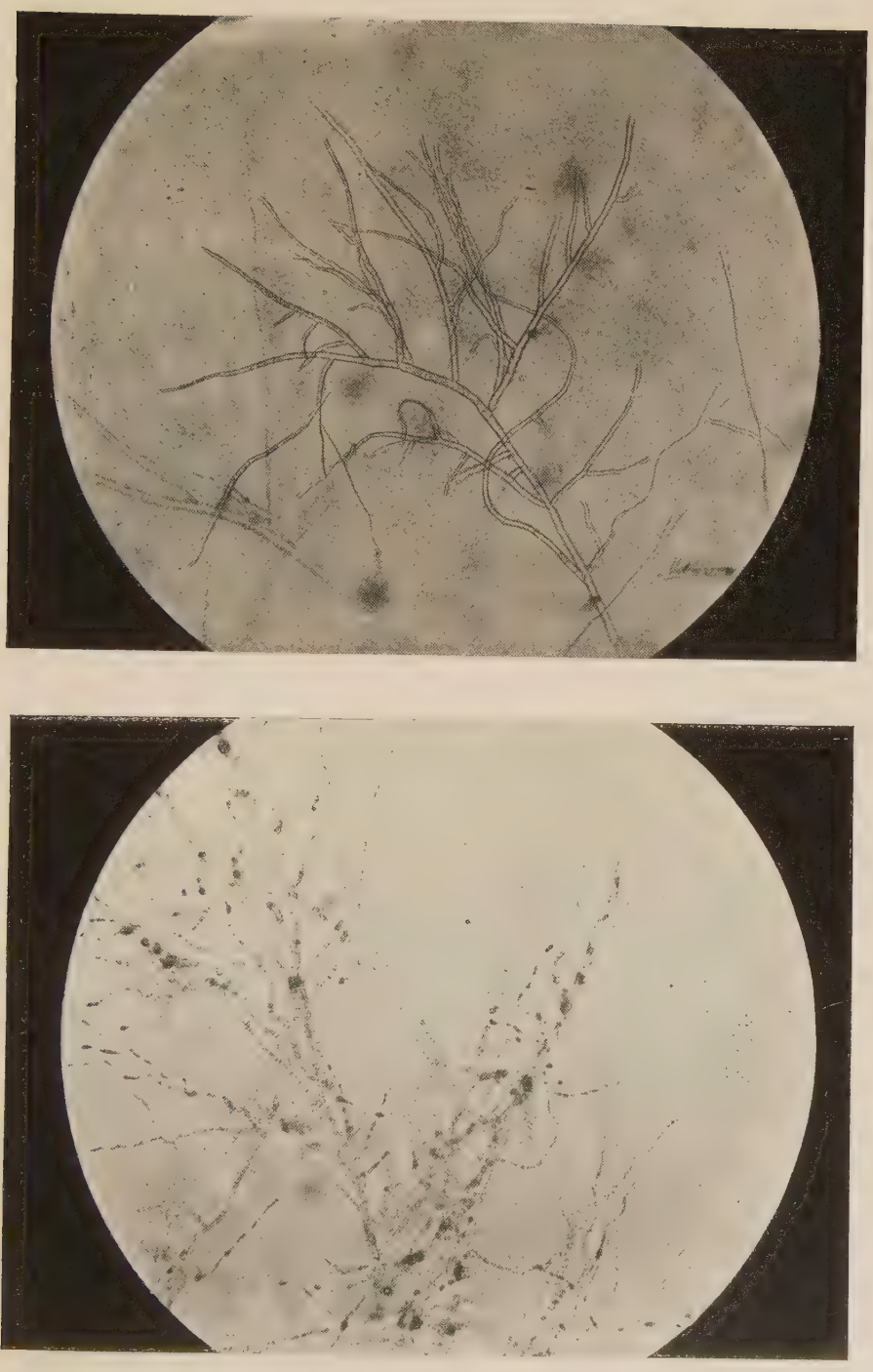


Fig. 19. — En haut : ramification de la race W. — En bas : ramification de la race V. Photographié sur les cultures.

Planche IV.

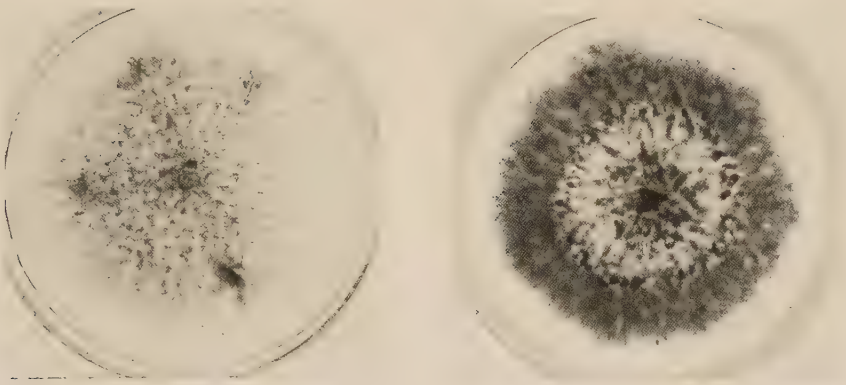


Fig. 21. — Colonies de *P. alternariacearum*. V. à gauche, W à droite, sur milieu Coonagar à base de Saccharose.

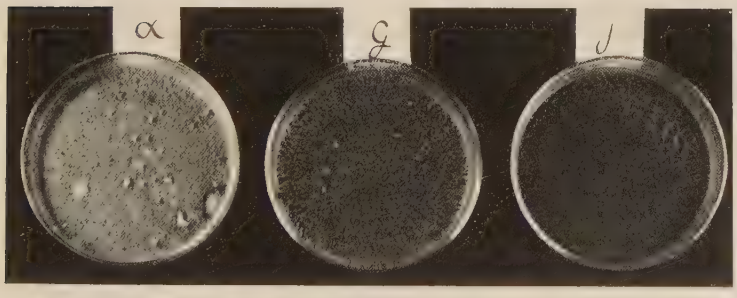
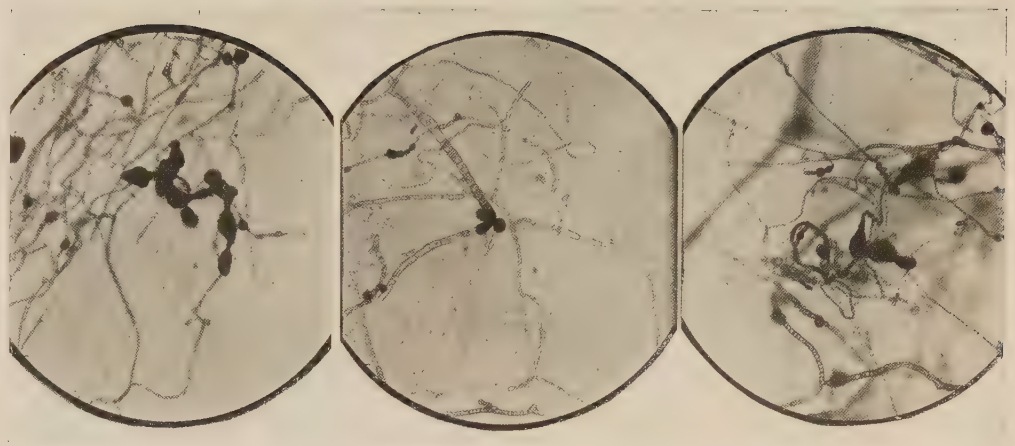


Fig. 23. — Croissance comparée des trois races sur milieu Coonagar. Cultures d'un mois.



α G γ

Fig. 29. — Photographies des hypnocystes apparues sur des milieux Coonagar sans asparagine pour les races α, G, γ.

Fig. 32. — Croissance des races α, G, γ, sur des rondelles de pomme de terre.

Planche VII.

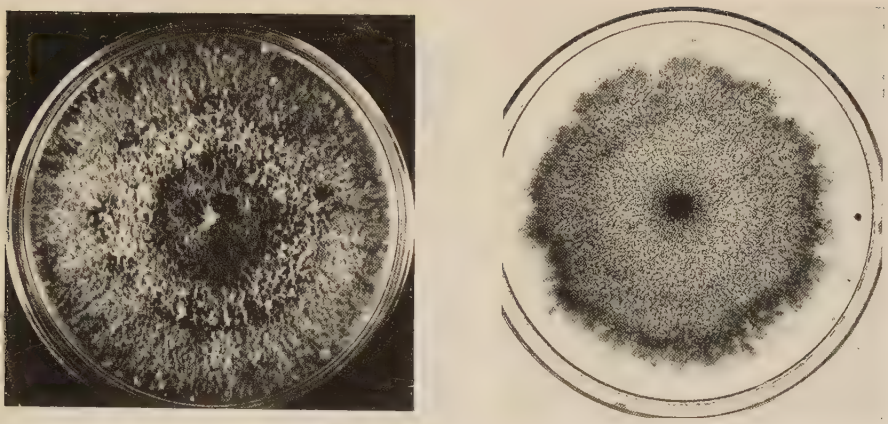


Fig. 30. — A gauche, race α, à droite race γ sur milieu Coonagar.

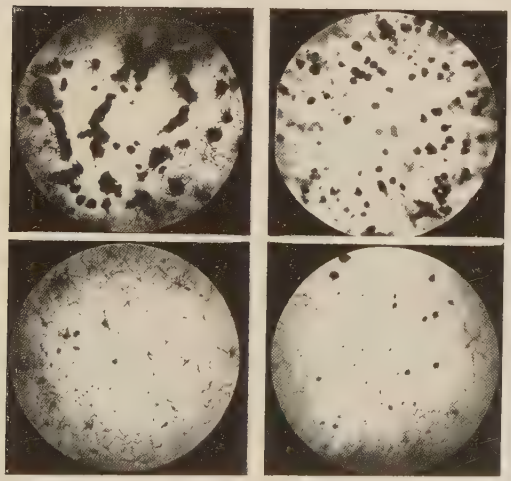


Fig. 31. — Comparaison des pycnides de la race α, haut gauche, et de la race γ, haut droite (Coonagar). En bas, les mêmes sur milieu amido-agar.

Planche VIII.

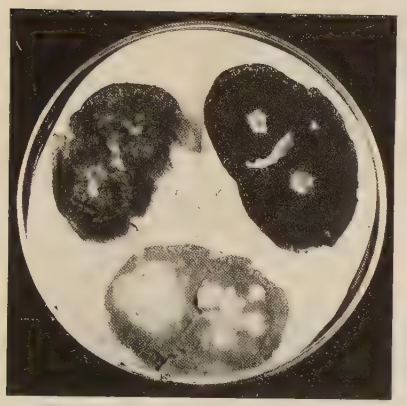


Fig. 33. — Milieu pomme de terre.

Fig. 35. — Milieu pain.

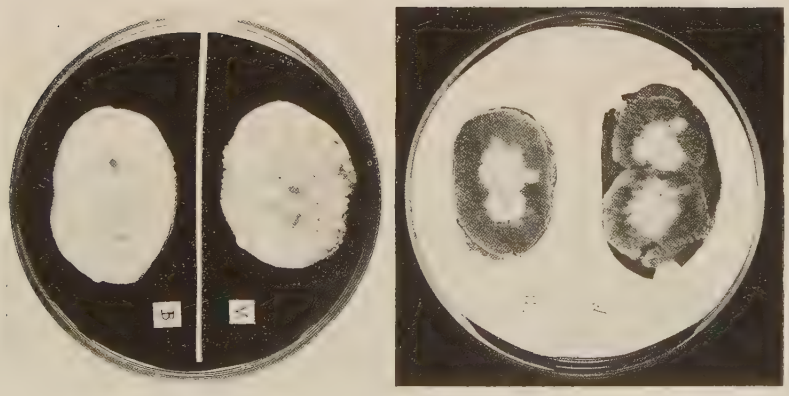


Fig. 34. — Milieu pomme de terre.

Planche IX.

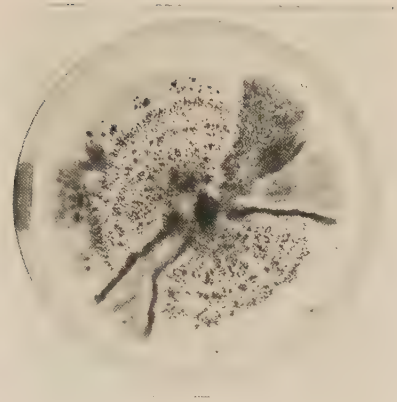


Fig. 39. — Boite sectorienne No 5..

Fig. 40. — Zone α pycnides et hypnocystes.

Fig. 44. — Zone stérile hypnocystes.

Fig. 43. Zone γ ; pycnides.

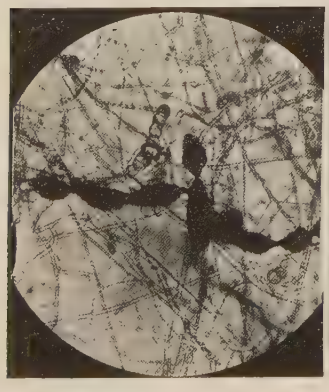


Fig. 41. — Zone α hypnocystes.

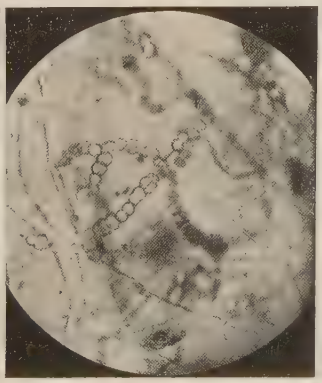


Fig. 42. — Zone α Strepto-hypnocystes.

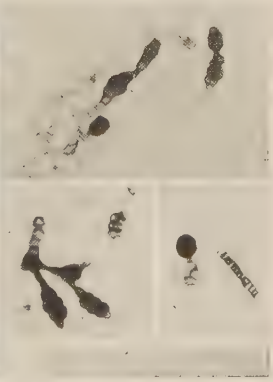


Fig. 45. — Zone stérile, hypnocystes.

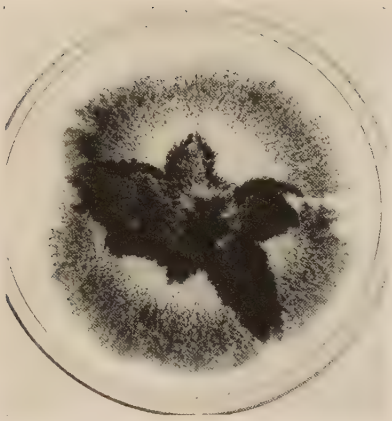


Fig. 46. — Boîte sectorienne No 6 : Race γ sur Coonagar.

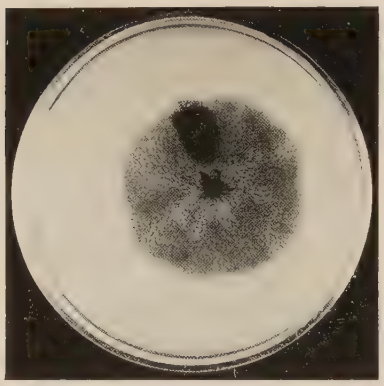


Fig. 48. — Boîte sectorienne No 11 : Race γ sur Coonagar-saccharose.

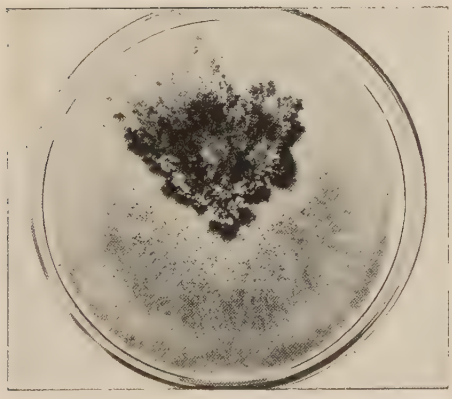


Fig. 47. — Boîte sectorienne No 7 : Race γ sur milieu amidon-agar. A gauche, lumière transparente ; à droite, lumière rasante.

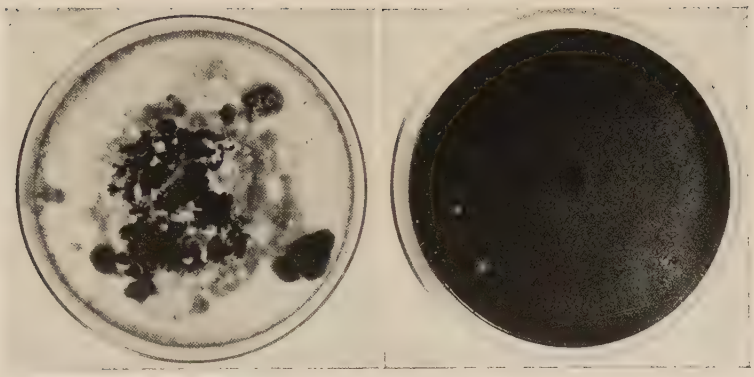


Fig. 36. — A gauche, race V ; à droite, race W sur moût-agar neutre.

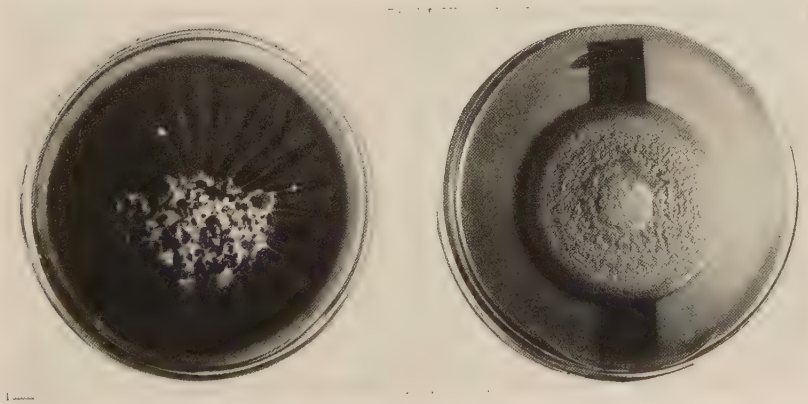


Fig. 49. — Race V sur moût-agar acide. Même souche de départ ; à gauche, forme mutée ; à droite, forme normale.

Planche XII.

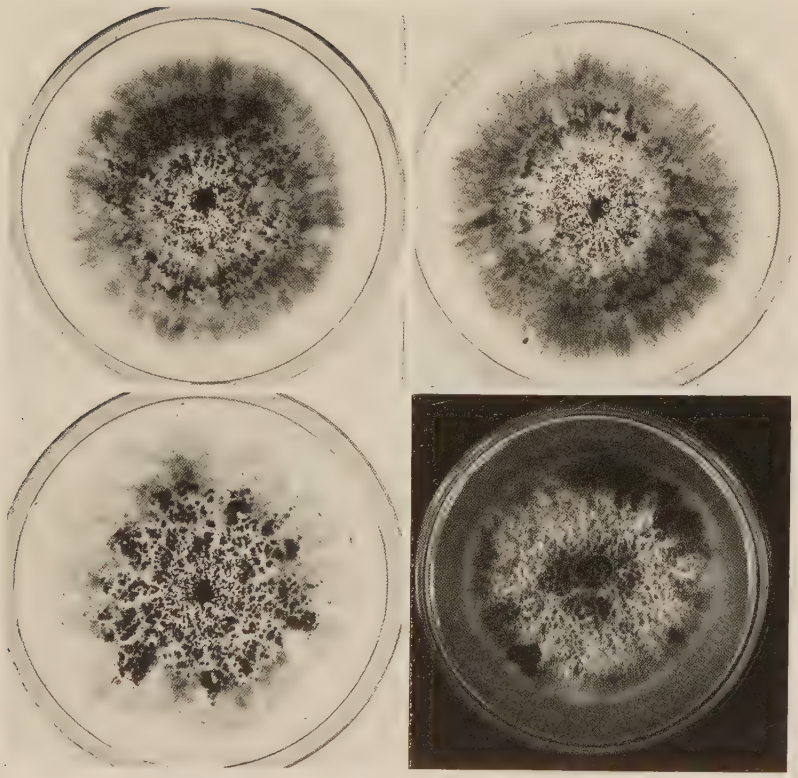


Fig. 50. — Cultures en haut, à gauche, de α sur Coonagar maltose ; à droite, idem ; mais d'une autre souche d'α. — En bas, à gauche, α sur Coonagar-galactose ; à droite, α sur Coonagar-saccharose.

Planche XIII.

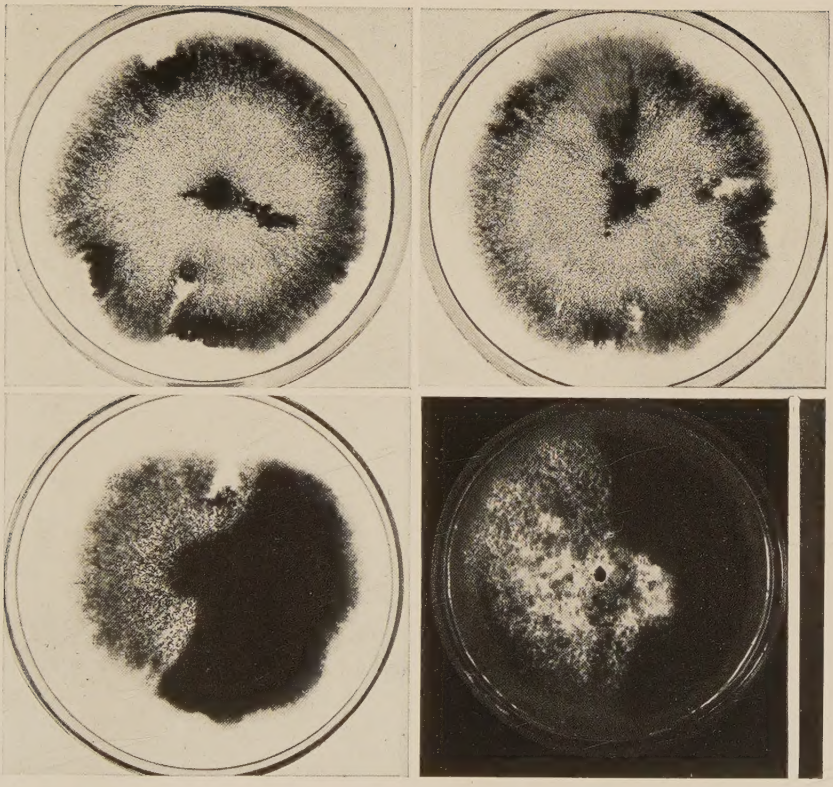


Fig. 51. — Culture en haut à gauche (*a*) du *P. alternariacearum* γ sur Coonagar-maltose ; à droite (*b*) colonie sectorienne No 72, idem, mais d'une autre souche. — En bas, à gauche (*c*) colonie sectorienne No 13, race γ sur Coonagar-saccharose ; à droite, (*d*) race γ sur Coonagar-galactose ; colonie sectorienne No 14.